

**Analyse von Meerschweinchen Satelliten-DNAs
und Chromatin mit Hilfe von Nukleasespaltungen**

Werner Altenburger

1977

Analyse von Meerschweinchen Satelliten-DNAs
und Chromatin mit Hilfe von Nukleasespaltungen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München



vorgelegt von
Werner Altenburger
aus Nussbaumen, TG, Schweiz

München 1977

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.G. Zachau

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juli 1977



Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von Oktober 1974 bis Februar 1977 ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. G. Zachau, unter dessen Anleitung diese Arbeit entstand, und Herrn Dr. W. Hörz bin ich zu Dank verpflichtet.

Die Ergebnisse der Arbeit sind teilweise veröffentlicht worden.

W. Altenburger, W. Hörz, H.G. Zachau
Nature 264, 517-522 (1976)

W. Altenburger, W. Hörz, H.G. Zachau
Eur.J.Biochem. 73, 393-400 (1977)

H.G. Zachau, W. Altenburger, W. Greil, W. Hörz, T. Igo-Kemenes, International Symposium on the Organisation and Expression of Eukaryotic Genome, Academic, New York (im Druck) (Hrsg. E.M. Bradbury, K. Javaherian).

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1.0 Einleitung und Problemstellung.....	1
2.0 Die Meerschweinchen Satelliten DNA-Komponenten.....	4
2.1 Isolierung und Auftrennung der Satelliten DNAs.....	4
2.2 Satelliten I-DNA.....	6
2.2.1 Diskussion der Satelliten I-DNA	8
2.3 Satelliten II-DNA	9
2.4 Satelliten III-DNA	9
2.4.1 Abbau der Satelliten III-DNA mit der Restriktionsnuklease Bsu	10
2.4.2 Abbau der Satelliten III-DNA mit anderen Restriktionsnukleasen	14
2.4.3 Diskussion der Satelliten III-DNA	17
2.5 Abschlußdiskussion der Meerschweinchen Satelliten-DNAs	18
3.0 Analyse der Chromatinstruktur mit Hilfe von DNAase II	21
3.1 Abbau von Chromatin im Zellkern mit DNAase II	21
3.2 Abbau von EDTA-behandeltem Chromatin und isolierten oligomeren Nukleosomen mit DNAase II	28
3.3 Einfluß von Histon H1 auf den Abbau von Chromatin mit DNAase II bzw. Micrococcus-Nuklease	33
3.3.1 Entfernung von Histon H1 aus dem Chromatin und "Rekonstitution" mit Histon H1	37
3.3.2 Zugabe von H1-Fragmenten zu H1-freiem Chromatin und Abbau mit DNAase II bzw. Micrococcus-Nuklease	43
3.4 Analyse der Einzelstrangfragmente aus dem DNAase II-Abbau von Mäuseleberkernen	45
3.5 Diskussion der Ergebnisse aus dem Chromatinabbau mit DNAase II	48
4.0 Zusammenfassung der Ergebnisse	51
5.0 Materialien und Methoden	54
5.1 DNA-Isolierung aus Meerschweinchenleber	54

5.2	$\text{Ag}^+/\text{Cs}_2\text{SO}_4$ -Dichtegradientenzentrifugation	55
5.3	Restriktionsnukleasen	55
5.4	Gelelektrophorese	56
5.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	56
5.6	Zellkernisolierung, EDTA-Behandlung von Zellkernen und Herstellung von löslichem Chromatin mit Nukleasen	57
5.7	H1-Entfernung aus Chromatin mit tRNA	57
5.8	Zugabe von Histon H1 bzw. H1-Fragmenten zu H1-freiem Chromatin	58
6.0	Literaturverzeichnis	59
7.0	Abkürzungsverzeichnis	64

Lebenslauf

1.0 Einleitung und Problemstellung

Im Unterschied zum prokaryontischen Genom weist das Genom der Eukaryonten, d.h. der zellkernhaltigen Organismen, wie durch Renaturisierungskinetiken gezeigt wurde, außer den in geringer Kopienzahl vorkommenden Genen, sogenannte mittelrepetitive und hochrepetitive Elemente auf (1-4). In vielen Fällen ist es aufgrund abweichender Basenzusammensetzung möglich, hochrepetitive Komponenten durch Dichtegradienten-Zentrifugation von der übrigen DNA abzutrennen (5-9). Diese hochrepetitiven Anteile werden dann als "Satelliten-DNA" bezeichnet. In einigen Organismen machen die Satelliten-DNAs bis zu 60 % der Gesamt-DNA aus. Eine Aussage über mögliche Funktionen dieser DNA-Komponenten ist bis heute nicht möglich. Man weiß, daß sie im zentromeren Heterochromatin gehäuft auftreten und nicht für Proteine kodieren, da in vivo keine RNA-Transkripte gefunden werden konnten (10).

Im Grad ihrer Sequenzhomogenität weisen die Satelliten-DNAs große Unterschiede auf. So konnte durch direkte Sequenzierung gezeigt werden, daß sie in bestimmten Fällen aus sich wiederholenden, kurzen Oligonukleotidsequenzen aufgebaut sind (11-14). Andere Satelliten-DNAs wiederum, darunter die aus Mäuse- und Meerschweinchen-DNA, sind in ihrem Aufbau komplexer und eine Grundsequenz ist nicht klar erkennbar (15,16). In den meisten Fällen sind die Satelliten-DNAs in sehr nahe verwandten Arten ganz verschieden, was auf ein schnelles Entstehen von neuen und ein rasches Verschwinden von alten hochrepetitiven DNA-Komponenten im Verlauf der Evolution hindeutet. Zur Deutung der Evolution von Satelliten-DNAs wurden zwei verschiedene Hypothesen vorgeschlagen. Nach dem Modell von Britten et al. (17) und Walker (1,18) erfolgt die Evolution dieser DNAs in verschiedenen Stufen, wobei sich rasche Multiplikation kurzer DNA-Stücke zu hochrepetitiven Sequenzen (saltatorische Amplifikation) mit längeren Zeiträumen langsamer Divergenz aufgrund von Mutation abwechseln. Nach der Theorie von Smith (19,20) erhalten alle DNA-Sequenzen, die keiner bestimmten Selektion unterliegen, durch den Mechanismus des "ungleichen Crossing over" im Verlauf der Evolution repetitive Struktur.

Ein weiterer Unterschied zum prokaryontischen Genom besteht darin, daß der größte Teil der eukaryontischen DNA im Zellkern lokalisiert ist und mit Proteinen verpackt vorliegt. Die weitaus häufigsten Proteine im Zellkern sind die Histone, die aufgrund ihrer Basizität besonders stark mit der DNA in Wechselwirkung treten (21,22). Folgende drei Klassen von Histonen sind zu unterscheiden:

- a. Lysinreiche Histone (H1, H5), die in ihren Aminosäuresequenzen wenig konserviert sind und in mehreren Subfraktionen auftreten.
- b. Wenig lysinreiche Histone (H2A, H2B), deren Aminosäuresequenzen stärker konserviert sind als die der lysinreichen Histone.
- c. Argininreiche Histone (H3, H4), die sehr stark konserviert sind, wie vergleichende Sequenzanalysen dieser Histone aus verschiedenen Eukaryonten gezeigt haben.

Für das Verständnis der Genexpression und Genregulation in Eukaryonten ist außer der Analyse des Aufbaus der DNA eine bessere Kenntnis ihrer Organisation im Zellkern, d.h. der Chromatinstruktur Voraussetzung. Die Vorstellungen über diese Struktur haben in den letzten Jahren eine grundsätzliche Wandlung erfahren. Gestützt vorwiegend auf Röntgenbeugungsdaten (23) hatte man früher angenommen, daß die DNA im Zellkern kontinuierlich mit Histonen bedeckt sei. Diese Interpretation der Röntgendaten wurde in neueren Versuchen widerlegt (24,25). So konnte durch elektronenmikroskopische Analysen gezeigt werden, daß das Chromatin aus diskreten Partikeln besteht, die wie Perlen auf dem DNA-Faden aufgereiht sind (72,73). Weiterhin fand man nach Abbau von Chromatin mit einer endogenen Nuklease und Analyse der DNA-Abbauprodukte eine regelmäßige Serie von Fragmenten, die in ihrer Größe Vielfachen des kleinsten Fragmentes entsprachen (74). Die neuen Ergebnisse führten zu Modellen, wonach das Chromatin in Untereinheiten gegliedert ist, die als Nukleosomen bezeichnet werden. Je zwei Moleküle der Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden die Kernstruktur des Nukleosoms. Das Histon H1 ist zur Ausbildung dieser Struktur nicht erforderlich, beeinflusst aber möglicherweise den Abstand zwischen den Nukleosomenkernen und ist für deren Wechselwirkung untereinander mit verantwortlich (26,27). Die regelmäßige Serie von Fragmenten beim Abbau von Chromatin mit Nukleasen entsteht durch

Spaltung der DNA zwischen den Chromatin-Untereinheiten.

Erweitert wurde dieses Chromatin-Modell durch Ergebnisse aus dem Chromatinabbau mit DNAase I (28), die am besten durch die Annahme erklärt werden, daß in dem DNA-Histon-Komplex die DNA außen auf den Proteinen, d.h. um diese herum gewunden ist. Außerdem deuten die Abbaumuster darauf hin, daß die DNA der Chromatin-Untereinheit so angeordnet ist, daß sich gewisse Strukturelemente regelmäßig wiederholen. Diese Vorstellung kommt auch in Nukleosomen-Modellen zum Ausdruck, die in konstanten Abständen eine stärkere Richtungsänderung (Knick) in der DNA postulieren (29,30).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Beiträge zur Analyse hochrepetitiver DNA-Komponenten und zu Fragen der Chromatinstruktur zu liefern. Als Methode sollte der Abbau von freier DNA bzw. DNA im Chromatin mit Hilfe von Nukleasen zur Anwendung kommen. Von der Analyse der Satelliten-DNAs aus Meerschweinchen mit Restriktionsnuklease versprach man sich, Aufschlüsse über Sequenzhomogenität der DNA-Komponenten zu erhalten und Aussagen über Periodizitäten höherer Ordnung machen zu können. Außerdem sollten die Untersuchungen behilflich sein, Überlegungen über Entstehungsmöglichkeiten dieser DNAs anzustellen. Das besondere Interesse bei der Analyse der Chromatinstruktur in dieser Arbeit galt der DNA-Histon-Wechselwirkung. Da schon länger bekannt war, daß die Ionenbedingungen die Kondensation des Chromatins stark beeinflussen (31), und da die bisher für den Chromatinabbau hauptsächlich verwendeten Nukleasen die Gegenwart von divalenten Kationen nötig haben, sollte hier eine Nuklease eingesetzt werden, für deren Aktivität solche Ionen nicht erforderlich sind.

2.0 Die Meerschweinchen Satelliten-DNA-Komponenten

Erste Hinweise auf Satelliten-DNAs aus Meerschweinchengewebe geben die Untersuchungen von Kit (7), der durch Zentrifugation im CsCl-Dichtegradienten die Satelliten I-DNA von der übrigen DNA abtrennen konnte. Einige Jahre später isolierten Corneo et al. (8,9) durch $\text{Ag}^+/\text{Cs}_2\text{SO}_4$ -Dichtegradientenzentrifugation drei verschiedene Satelliten-DNAs und charakterisierten diese mit Hilfe von physikalischen Methoden.

Für Fragen, die die Evolutionsmechanismen von Satelliten-DNAs betreffen, ist es von besonderem Interesse, den Aufbau dreier verschiedener hochrepetitiver Komponenten in ein und demselben Organismus zu vergleichen.

2.1 Isolierung der DNA-Fractionen

Die DNA-Gewinnung aus Lebergewebe wurde nach der Methode von Flamm et al. (6) durchgeführt, mit dem Unterschied, daß der Pronase- und RNAase-Schritt durch eine Hydroxyapatit-Säule ersetzt wurde, um letzte Reste von Protein und RNA zu entfernen (32,33). Die Auftrennung der DNA erfolgte im $\text{Ag}^+/\text{Cs}_2\text{SO}_4$ -Dichtegradienten nach Corneo et al. (8). Das Gradientenprofil (Abb. 1) entspricht dem dort beschriebenen und soll veranschaulichen, welche Fraktionen im folgenden als Satellit I, II bzw. III bezeichnet werden.

Zur weiteren Charakterisierung der als Satellit II bzw. Satellit III isolierten DNA-Fractionen wurden die Schwimmdichten der einzelnen DNA-Stränge in einem alkalischen CsCl-Dichtegradienten ermittelt und mit den in Ref. 9 angegebenen Werten verglichen. Dabei stellte sich heraus, daß die hier gefundenen Werte (bezogen auf Satellit I als Marker) nicht genau mit den dort angeführten übereinstimmen. Die Dichtedifferenzen zwischen leichtem und schwerem Strang in den beiden Satelliten-DNAs sind aber mit den von Corneo et al. (9) angegebenen identisch (Abb. 2).

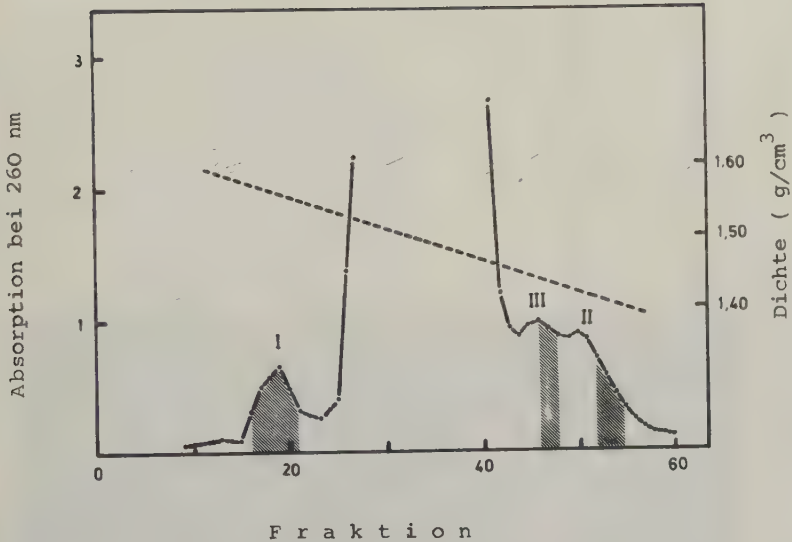
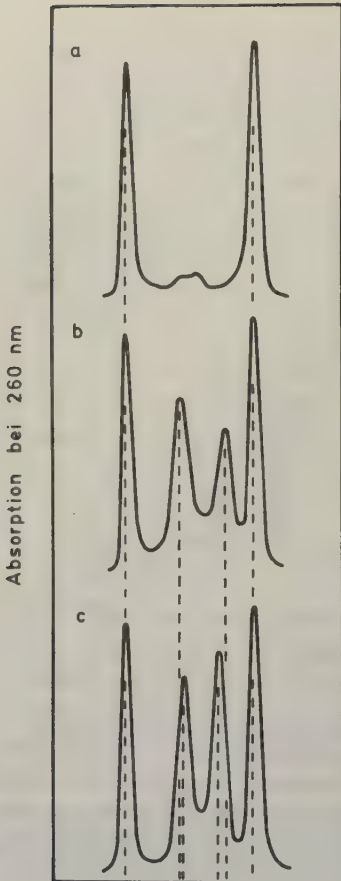


Abb. 1: Präparative Auftrennung von Meerschweinchen-DNA durch $\text{Ag}^+/\text{Cs}_2\text{SO}_4$ -Dichtegradienten-Zentrifugation

Die DNA aus Meerschweinchenleber wurde wie unter 5.1 beschrieben isoliert und in einem $\text{Ag}^+/\text{Cs}_2\text{SO}_4$ -Dichtegradienten im Beckman Rotor 35 zentrifugiert (Kap. 5.2).⁴ In der Abbildung ist das Absorptionsprofil der DNA aus dem Gradienten aufgezeichnet. Die schattierten Flächen zeigen die Fraktionen, die als Satelliten I, II und III gesammelt wurden. Die gestrichelte Linie entspricht dem Dichteverlauf im Gradienten.



	Dichte (g x cm ⁻³)	
a	1.692	1.778
b	1.727	1.758
c	1.729	1.752

Abb. 2: Strangtrennung von Satelliten DNA-Komponenten im alkalischen CsCl-Dichtegradienten

5 µg DNA pro Komponente wurden im alkalischen CsCl-Gradienten (9,37) in der analytischen Ultrazentrifuge (Beckman, Modell E) untersucht. Die Anfangsdichte des Gradienten betrug 1,70 g/cm³, zentrifugiert wurde 16 Std. mit 44 000 Upm bei 23°C. a. Satelliten I-DNA. Die beiden DNA-Stränge dieses Satelliten, deren Schwimmdichten von Corneo et al. (9) mit 1.692 g/cm³ und 1.778 g/cm³ angegeben wurden, dienten in b und c als Dichtemarker. b. Satelliten I- und Satelliten II-DNA. Die Schwimmdichten der beiden Stränge der Satelliten II-DNA wurden relativ zu den beiden Satelliten I-DNA-Strängen berechnet. Zum Vergleich sind die Schwimmdichten aus Referenz 9 in Klammern angegeben. Die errechneten Werte sind 1.727 g/cm³, (1.738) für den leichten Strang und 1.758 g/cm³, (1.769) für den schweren Strang. Die Differenz in den Schwimmdichten der beiden Stränge beträgt 0.031 g/cm³, (0.031). c. Satelliten I- und Satelliten III-DNA. Die errechneten Werte sind 1.729 g/cm³, (1.740) für den leichten Strang, 1.752 g/cm³, (1.762) für den schweren Strang. Die Differenzen betragen 0.023 g/cm³, (0.022).

2.2 Meerschweinchen Satelliten I-DNA

Der Abbau der Satelliten I-DNA, auch α-Satelliten-DNA genannt, mit sieben Restriktionsnukleasen zeigt in der Gelelektrophorese neben heterogenen Spaltprodukten schwache, diskrete Banden (Abb. 3). Die Hauptmenge der DNA bleibt dabei größer als 3000 Nukleotidpaare.

Eine Ausnahme bildet die Spaltung durch die Restriktionsnuklease Alu. Für die Abbauprodukte durch diese Nuklease konnte durch Coelektrophorese mit linearer λ dv1 und λ dv21 DNA als Molekulargewichtsreferenzen gezeigt werden, daß weniger als 5 % der DNA nach Abbau größer als 3000 Nukleotidpaare bleibt. Das Spaltmuster, das größere Regelmäßigkeiten vermissen läßt und eher dem einer Hauptbanden-DNA ähnelt, deutet auf einen sehr wenig einheitlichen Aufbau dieser Satelliten-DNA hin.

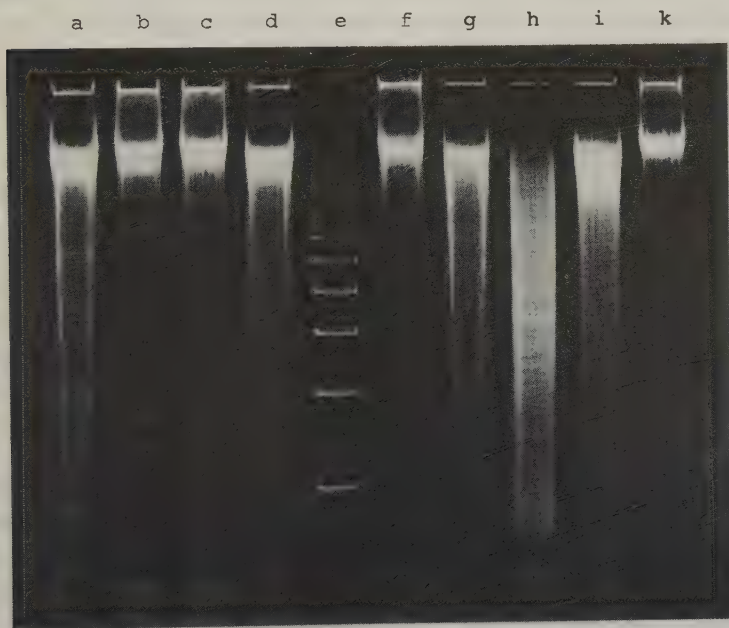
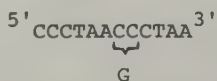


Abb. 3: Abbau von Satelliten I-DNA mit sieben Restriktionsnukleasen

5 μ g Satelliten I-DNA wurden mit verschiedenen Restriktionsnukleasen abgebaut und die Abbauprodukte auf einem 1,5 % Agarose-Plattengels analysiert. a. Bsu, b. Eco RI (Standard), c. Eco RI (hoher pH-Wert), d. Eco RII, f. Hind II, g. Hind III, h. Alu, i. Hpa II, k. Inkubation ohne Nuklease. e. zeigt ein Mäuse Satelliten Eco RII-Abbaumuster als Molekulargewichtsreferenz. Die Größe dieser Fragmente entspricht einer arithmetischen Reihe von ungefähr 245 Nukleotidpaaren (35).

2.2.1 Diskussion der Satelliten I-DNA

Durch die Oligopyrimidin -Analyse der Meerschweinchen Satelliten I-DNA zeigte Southern (15), daß diese DNA zwar sehr heterogen ist, dennoch aber eine einfache Ursequenz angenommen werden kann ($5' \text{CCCTAA}^3'$ für den L-Strang), von der ausgehend der heutige Satellit durch aufeinanderfolgende Prozesse der Amplifikation und Divergenz entstanden sein könnte. Die Tatsache, daß die Abbaumuster mit den meisten Restriktionsnukleasen nur schwache, diskrete Banden in unregelmäßigen Abständen zeigen, stimmt gut mit diesen Sequenzdaten überein. Auch der relativ starke Abbau mit der Nuklease Alu steht dazu nicht im Widerspruch. Obwohl die Spaltsequenz von Alu ($5' \text{AGCT}^3'$) in der Ursequenz, wie sie von Southern postuliert wurde, nicht enthalten ist, kann sie z.B. durch eine Substitution von einem CC durch ein G eingeführt werden:



Aus dem Abbaumuster kann abgeschätzt werden, daß die Spaltsequenz für Alu ungefähr alle 1000 Nukleotidpaare vorkommt. Da der L-Strang ungefähr 4 % G enthält (34), ist die Häufigkeit und unregelmäßige Verteilung der Sequenz $5' \text{AGCT}^3'$ durchaus in Übereinstimmung mit den Sequenzdaten. Es ist bemerkenswert, daß unter allen bisher bekannten Spaltsequenzen von Restriktionsnukleasen die Sequenz $5' \text{AGCT}^3'$ der für den Satelliten postulierten Ursequenz am nächsten kommt. Nur die Spaltsequenzen $5' \text{TTAA}^3'$ oder $5' \text{CTAG}^3'$ für bisher noch nicht gefundene Restriktionsnukleasen müßten in diesem Satelliten noch häufiger vorkommen.

Die hier festgestellte Heterogenität der Satelliten I-DNA steht auch im Einklang mit deren Verhalten in Renaturierungskinetiken von Corneo et al. (9), die einen $\text{Cot}_{1/2}$ -Wert für diese DNA finden, der um zwei Größenordnungen höher liegt als der der meisten Satelliten DNAs und aus dem sich eine Sequenzkomplexität von ungefähr 10^5 Nukleotidpaaren errechnet (3).

2.3 Meerschweinchen Satelliten II-DNA

Die Satelliten II-DNA wurde in gleicher Weise wie die Satelliten I-DNA analysiert, wobei die Reinheitskontrolle dieser Komponente etwas problematisch war. Wegen des annähernd gleichen Verhaltens von Satellit II und Satellit III sowohl im $\text{Ag}^+/\text{Cs}_2\text{SO}_4^-$, wie auch im alkalischen CsCl -Dichtegradienten und in den Schmelzkurven (9), war es nicht einfach, den Grad der Verunreinigung an Satelliten III-DNA zu bestimmen. Aus diesem Grund wurde in einigen Versuchen jede einzelne Satelliten-DNA-Fraktion von Nr.44-55 des in Abbildung 1 dargestellten Gradienten mit mehreren Restriktionsnukleasen gespalten. Die Fraktion mit der niedrigsten Schwimmdichte, von der angenommen werden kann, daß darin fast ausschließlich Satelliten II-DNA enthalten ist, gab kein Anzeichen für einen Abbau mit den Restriktionsnukleasen Eco RI, Hind II, Hind III und Bsu. Mit den Restriktionsnukleasen Eco RII und Alu entstand eine Anzahl sehr schwacher Banden im Größenbereich von 1000 Nukleotidpaaren. Diese Bandenmuster unterschieden sich vom charakteristischen Satelliten III-DNA Abbaumuster, waren aber einer weiteren Analyse und Quantifizierung nicht zugänglich, da sie in ihren Intensitäten nur unwesentlich über dem Untergrund lagen.

2.4 Meerschweinchen Satelliten III-DNA

Wie bei der Satelliten II-DNA bestand auch bei der Satelliten III-DNA das Problem der Reinheit. Zum einen war es die Verunreinigung dieser DNA mit Hauptbanden-DNA, zum anderen mit Satelliten II-DNA. Wurde die Satelliten III-DNA mit der Restriktionsnuklease Bsu zu Ende gespalten, so sah man in der gelelektrophoretischen Analyse außer dem charakteristischen Abbaumuster (Abb. 4a) einen ungespaltenen Anteil im hochmolekularen Bereich. Dieser Anteil dürfte von der Satelliten II-DNA herrühren, da er in den Satellitenfraktionen mit höherer Schwimmdichte geringer wurde. Auf der anderen Seite nahm aber in Fraktionen mit steigender Schwimmdichte, aufgrund des steigenden Anteils an Hauptbanden-DNA, nach Abbau mit Restriktionsnukleasen der Untergrund von heterogenen Spaltprodukten zu.

Eine Rezentrifugation im $\text{Ag}^+/\text{Cs}_2\text{SO}_4$ -Dichtegradienten brachte bei schlechterer Ausbeute nur eine unwesentlich bessere Auftrennung der Satelliten II- und Satelliten III-DNA, so daß in den meisten Fällen auf eine solche Weiterreinigung verzichtet wurde.

2.4.1 Abbau der Satelliten III-DNA mit der Restriktionsnuklease Bsu

Die Spaltstücke, die man beim Abbau von Satelliten III-DNA mit der Restriktionsnuklease Bsu erhält, wandern bei der Gelelektrophorese in Dreiergruppen mit einer zusätzlichen Bande nahe an der Front.

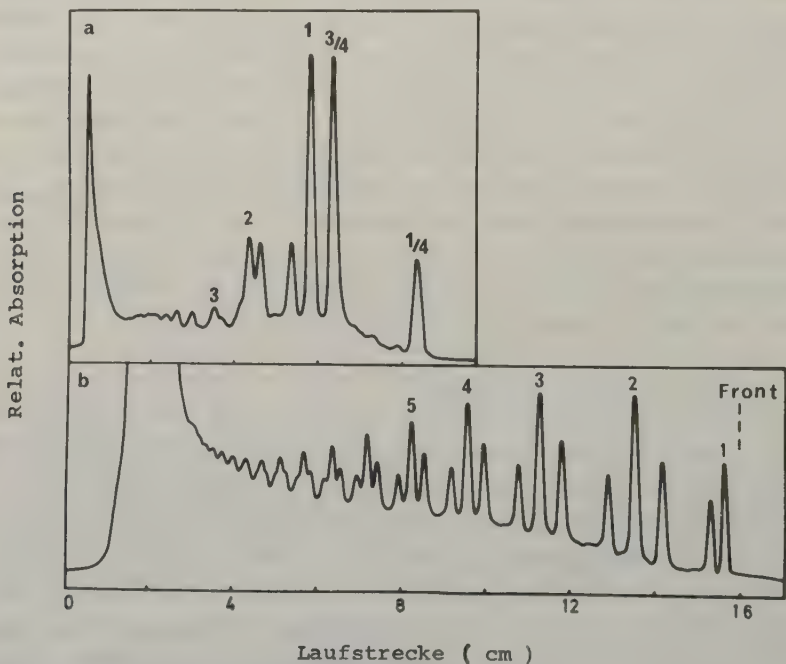


Abb. 4: Abbau von Satelliten III-DNA mit Bsu

Je 5 μg Satelliten III-DNA wurden mit der Nuklease Bsu inkubiert und die Spaltprodukte durch Gelelektrophorese analysiert. a. zeigt das Densitogramm des Bsu-Endmusters auf einem 8% Akrylamid-Rundgel, b. das Densitogramm eines Partialmusters auf einem 1,5% Agarose-Rundgel. Die Zahlen in den Densitogrammen geben die Größe der Spaltstücke in Vielfachen der repetitiven Einheit an.

Wird die Satelliten DNA nicht bis zu Ende gespalten, so können in den Abbaumustern bis zu 14 solcher Triplets gezählt werden (Abb.4b).

Das Molekulargewicht der Fragmente wurde durch Coelektrophorese mit den Eco RII-Stücken der Mäuse Satelliten-DNA bestimmt (35). Dabei zeigte sich, daß die mittleren Fragmente jedes Triplets eine arithmetische Reihe von Vielfachen einer Einheit von ungefähr 215 Nukleotidpaaren bilden, und daß die beiden anderen zum Triplett gehörenden Fragmente jeweils um $1/4$ dieses Wertes, also etwa 55 Nukleotidpaare größer bzw. kleiner sind. Dieses Ergebnis macht es wahrscheinlich, daß die Satelliten III-DNA aus sich wiederholenden Einheiten von 215 Nukleotidpaaren aufgebaut ist, mit je zwei potentiellen Spaltstellen für die Nuklease Bsu im Abstand von 55 Nukleotidpaaren.

Die postulierte Anordnung von Spaltstellen ist in Abbildung 5 zu sehen zusammen mit den Fragmenten, die auftreten, wenn durch Mutation einige Spaltsequenzen für das Enzym verloren gegangen sind. Sämtliche Stücke, die bei der Gelelektrophorese gefunden werden, entsprechen denen, die nach diesem Schema erwartet würden. Die repetitive Anordnung der Spaltstellen wurde dadurch bestätigt, daß nach partiellem Abbau der Satelliten III-DNA mit der Nuklease Bsu 375 Nukleotidpaare große DNA-Fragmente aus dem Gel isoliert und dann mit Bsu zu Ende gespalten wurden. Wie aufgrund des postulierten Spaltschemas zu erwarten war, traten bei dieser Nachspaltung keine DNA-Fragmente von 270 Nukleotidpaaren auf, wohl aber alle anderen Fragmente kleiner als 375 Nukleotidpaare (215, 160 bzw. 55 Nukleotidpaare). Die Nachspaltung von isolierten 215-Nukleotidpaar-Fragmenten aus einer Bsu-Partialspaltung lieferte bei weiterem Abbau mit Bsu Spaltstücke von ungefähr 55 und 160 Nukleotidpaaren, während sich die Fragmente von 160 Nukleotidpaaren Größe als mit Bsu nicht nachspaltbar erwiesen.

Wie Abbildung 4a zeigt, wird auch bei vollständiger Spaltung mit der Restriktionsnuklease Bsu die Satelliten III-DNA nicht ausschließlich in Fragmente von 55 und 160 Nukleotidpaaren abgebaut. Das bedeutet, daß in einigen repetitiven Einheiten die Spaltstellen fehlen. Um die Gesamtzahl und die Verteilung der Spaltstellen für die Nuklease Bsu in der Satelliten III-DNA zu ermitteln, wur-

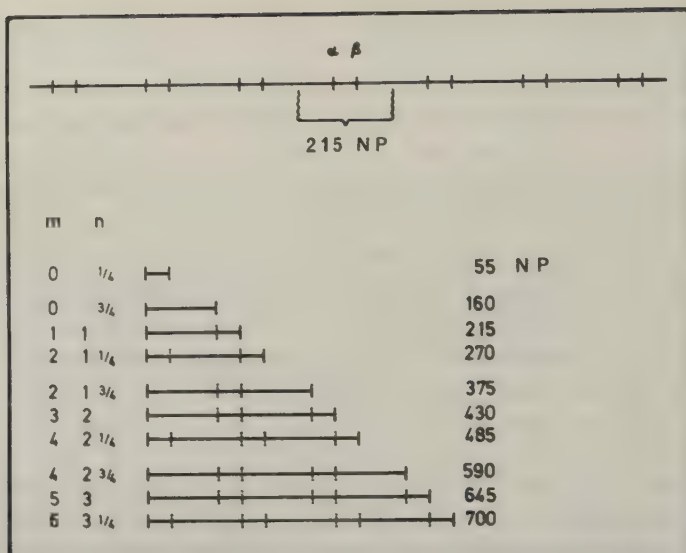


Abb. 5: Anordnung der Spaltstellen für Bsu auf der Satelliten III-DNA

Die oberste Linie symbolisiert einen Ausschnitt aus der Satelliten III-DNA mit der repetitiven Einheit von ungefähr 215 Nukleotidpaaren (mit Klammer bezeichnet) und der Anlage für die beiden darin enthaltenen Bsu-Spaltstellen α und β .

Darunter sind die 10 kleinsten Spaltstücke schematisch aufgezeichnet, die entstehen, wenn die Spaltung durch Bsu nicht an allen potentiellen Spaltstellen erfolgt.

m = Anzahl der nicht gespaltenen potentiellen Spaltstellen (gestrichelte Linien)

n = Anzahl der repetitiven Einheiten in den Spaltstücken

den die relative Menge (z) aller Fragmente aus einem Bsu-Endmuster (Abb. 4a) bestimmt und wie in Abbildung 6 gezeigt in einem Diagramm aufgetragen. Eine solche Auftragung gibt dann eine Gerade, wenn das Vorhandensein oder Fehlen von Spaltstellen einfacher Statistik folgt (35,36). Durch Vergleich mit theoretisch errechneten Geraden läßt sich aus der Steigung dieser Geraden direkt die Spaltwahrscheinlichkeit (p) bestimmen, d.h. der Anteil der Bsu-Spaltstellen auf der Satelliten III-DNA, der nach Mutation und Modifikation erhalten geblieben ist.

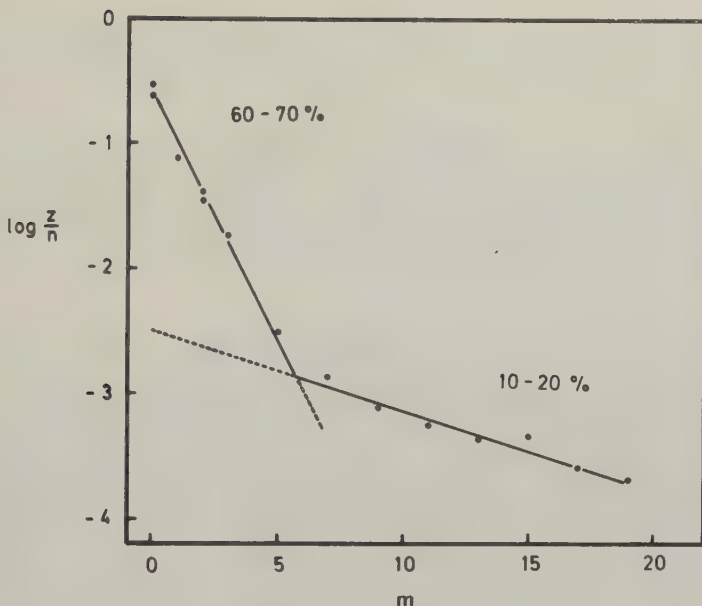


Abb. 6: Zwei verschiedene Verteilungen von Bsu-Spaltstellen auf der Satelliten III-DNA

Eine von der Statistik ausgehende Betrachtungsweise, wie sie bei anderen Satelliten-DNAs herangezogen worden war, um die Verteilung von Restriktionsnuklease-Spaltstellen zu erklären (36,38-40), wurde auch hier angewandt. Dabei waren einige Erweiterungen notwendig, um den hier zum ersten Mal vorliegenden Fall mit 2 Spaltstellen pro repetitiver Einheit zu erfassen.

Für den Fall, daß die Wahrscheinlichkeit der Spaltung (p), bei vollständigem Abbau mit der Restriktionsnuklease Bsu, an jedes der in Abbildung 5 gezeigten möglichen Stellen gleich groß ist, ergibt sich für die relative Menge der DNA (z) in den entstehenden Fragmenten folgende Funktion:

$$z = p^2 (1-p)^m \cdot n, \text{ bzw. } \log \frac{z}{n} = 2 \log p + m \log (1-p)$$

m ist die Zahl der nicht gespaltenen Spaltstellen in einem Fragment, dessen Länge dem n -fachen der repetitiven Einheit von 215 Nukleotidpaaren entspricht (Abb. 5). Im Diagramm ist $\log \frac{z}{n}$ gegen m aufgetragen. Da die m -Werte der Fragmente mit den Längen von $1/4$ und $3/4$, $1 1/4$ und $1 3/4$ usw. der repetitiven Einheit identisch sind (Abb. 5), gibt es für jeden geradzahlgigen m -Wert zwei Punkte. Die Fragmente mit ungeradzahlgigem m -Wert entstehen im Vergleich dazu in doppelter Menge, nämlich sowohl durch α - α , als auch durch β - β Spaltung (vergl. Text). Daher wurden die experi-

mentell ermittelten DNA-Mengen für diese Fragmente vor der Eintragung in das Diagramm halbiert. Von den höheren Multimeren konnten nur die der mittleren Bande des jeweiligen Triplets entsprechenden Fragmente quantifiziert werden.

Aus dem Anstieg der beiden durch die Punkte gelegten Geraden im Diagramm wird deutlich, daß es zwei verschiedene Verteilungen von Bsu-Spaltstellen in der Satelliten III-DNA geben muß. Aus den beiden Geraden läßt sich berechnen, daß ungefähr 90% der Satelliten III-DNA mit einer Wahrscheinlichkeit von $p = 0.6 - 0.7$ und ungefähr 10% mit einer Wahrscheinlichkeit von $p = 0.1 - 0.2$ gespalten werden.

Aus dem Diagramm (Abb. 6) wird ersichtlich, daß das Material in den Fragmenten mit niederen Molekulargewichten bis hinauf zum dritten Triplett, also die Hauptmenge der Spaltprodukte, mit einem Wert von $p = 0.6 - 0.7$ gut beschrieben werden kann. Das bedeutet, daß in einer Totalspaltung 60 - 70% der im Schema postulierten Spaltstellen durch die Restriktionsnuklease Bsu gespalten wurden. Den Berechnungen liegt die Annahme zugrunde, daß die Spaltwahrscheinlichkeit für die beiden Spaltstellen α und β gleich ist. Für die höheren Multimeren der Fragmentserie, die nur auf niederprozentigen Gelen quantifiziert werden können (Abb. 7), ergibt sich dagegen eine andere Gerade, die einer Spaltwahrscheinlichkeit von $p = 0.1 - 0.2$ entspricht.

Es soll noch erwähnt werden, daß gemäß der Statistik das mittlere Fragment jedes Triplets doppelt so häufig vorkommen muß wie die beiden anderen zum Triplett gehörenden Fragmente, da dieses Fragment, wie aus Abbildung 5 ersichtlich ist, sowohl durch Spaltung an zwei α - als auch an zwei β -Stellen entstehen kann. Die beiden anderen Fragmente hingegen können nur durch α - β bzw. β - α Spaltung gebildet werden. Abbildung 4 macht in Übereinstimmung damit deutlich, daß die mittlere Bande der Triplets immer prominenter ist als die beiden sie umgebenden.

2.4.2 Abbau der Satelliten III-DNA mit anderen Restriktionsnukleasen

Die Spaltmuster, die beim Abbau der Satelliten III-DNA mit den Restriktionsnukleasen Eco RI, Eco RII, Hind II und Alu erhalten wurden, sind in Abbildung 8 zu sehen. Die Restriktionsnukleasen

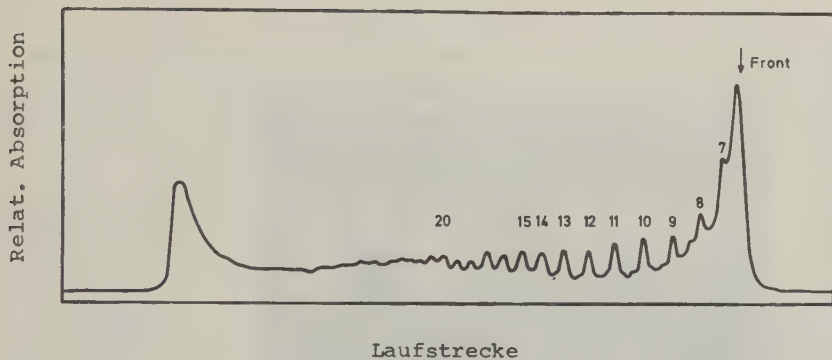


Abb. 7: Auftrennung der höheren Multimeren der 215-Nukleotidpaar-Serie nach Abbau von Satelliten III-DNA mit Bsu

5 μ g Satelliten III-DNA wurden mit der Nuklease Bsu vollständig gespalten und die Abbauprodukte auf einem 0.5 % Agarose-Rundgel elektrophoresiert. Die Zahlen im Densitogramm geben die Länge der Fragmente an, gemessen in repetitiven Einheiten.

Hind III und Hpa II bauten diese DNA nicht in sichtbarem Ausmaß ab. Mit den anderen Nukleasen entstand eine Serie von schwachen Banden im 215-Nukleotidpaar-Register. Ebenso gab es Andeutungen von zusätzlichen Banden, wie sie beim Abbau mit Bsu gefunden wurden. In keinem der Spaltmuster fehlten die Zwischenbanden völlig, doch ist ihre relative Menge verglichen mit den Banden im 215-Nukleotidpaar-Register sehr gering und von Nuklease zu Nuklease unterschiedlich. Wurde das mit diesen Nukleasen gesplante Material auf 0.6 % Agarosegelen analysiert, so zeigte sich deutlich, daß die Banden mit der größten Intensität in der Gegend des Dekamers lagen, und daß sowohl die schneller, als auch die langsamer wandernden Banden weniger intensiv waren. Der größte Teil der Satelliten DNA wurde aber von diesen Restriktionsnukleasen nicht angegriffen. Das weist darauf hin, daß die Spaltstellen für diese Enzyme nicht gleichmäßig auf der Satelliten-DNA verteilt, sondern auf Teile dieser DNA beschränkt sind, wie es für die Mäuse Satelliten-DNA im speziellen gezeigt wurde (35). Daß diese sogenannten Segmente wirklich auf derselben Satelliten-DNA liegen, die mit der Restriktionsnuklease Bsu das charakteristische Abbau-muster liefert, wurde durch Nachspaltungen gezeigt.



Abb. 8: Abbau von Satelliten III-DNA mit fünf Restriktionsnukleasen

Je 5 μ g Satelliten III-DNA wurden mit a. Bsu, b. Eco RI (standard), c. Eco RI (hoher pH-Wert), e. Eco RII, f. Hind II, g. Alu abgebaut und auf einem 1.5% Agarose-Plattengel elektrophoresiert. Der Abbau mit Bsu erfolgte unter Partial-, der mit den anderen Nukleasen unter Endmuster-Bedingungen. In d wurden die Eco RII-Fragmente aus Mäuse Satelliten-DNA als Molekulargewichtsreferenzen elektrophoresiert (35). Die mit den Zahlen 1 bzw. 2 bezeichneten Banden entsprechen dem 215 bzw. 430 Nukleotidpaar-Fragment.

Die Gesamtzahl der Abbauprodukte oder die isolierten 215- bzw. 160-Nukleotidpaar-Fragmente aus einer Bsu-Endspaltung der Satelliten III-DNA wurden mit den Nukleasen Eco RI, Eco RII, Hind II bzw. Alu nachgespalten und die Abbauprodukte elektrophoretisch analysiert. Die bei diesen Nachspaltungen neu entstandenen Fragmente sind in Abbildung 9 aufgeführt. Es ist bemerkenswert, daß diese Fragmente für alle Nukleasen von sehr ähnlicher Größe sind, d.h. die Spaltstellen für die genannten Nukleasen alle in der gleichen Region der repetitiven Einheit kartieren.

Unter der Annahme rein statistischer Verteilung der Spaltstellen innerhalb eines Satelliten-DNA-Segmentes errechnet sich die Spaltwahrscheinlichkeit für diese Enzyme mit $p = 0.1 - 0.2$, d.h. gleich der Spaltwahrscheinlichkeit, die für die höheren Multimeren des Bsu-Endmusters gefunden wurde.

Abb. 9: Nachspaltung von Bsu-Spaltstücken der Satelliten III-DNA mit vier Restriktionsnukleasen

Restriktions- nuklease	Neu entstandene Fragmente bei der Nachspaltung von:		
	Gesamt Bsu- Abbauprodukten	215 Nukleotid- paar-Bsu-Frag- menten	160 Nukleotid- paar-Bsu-Frag- menten
Eco RI	125,95	120,95	
Eco RII		110	100,60
Hind II	120,100	115,100	100,65
Alu	120,100		

Die Satelliten III-DNA wurde mit Bsu zu Ende gespalten, die Gesamtzahl der Abbauprodukte und/oder die isolierten 215- bzw. 160-Nukleotidpaar-Fragmente mit den Restriktionsnukleasen Eco RI (standard), Eco RII, Hind II und Alu inkubiert und danach auf 3% Agarose-Rundgelen analysiert. Die Größe der neu entstandenen Fragmente (in Nukleotidpaaren) sind in der Tabelle angeführt. Außer den aufgeführten Bruchstücken entstanden mit allen vier Nukleasen beim weiteren Abbau der Bsu-Gesamtspaltprodukte bzw. der 215 Nukleotidpaar-Bsu-Fragmente schwache Banden im Größenbereich von 150-170 Nukleotidpaaren. Aufgrund der 160 Nukleotidpaar-Fragmente, die als Verunreinigung auch in den isolierten 215 Nukleotidpaar-Fragmenten noch vorhanden waren, konnten diese Banden nicht eindeutig identifiziert werden. Außerdem konnten Fragmente, die kleiner als 60 Nukleotidpaare waren, in diesem Gelsystem nicht mehr aufgelöst werden, da sie bei der Elektrophorese zu dicht an der Front wanderten.

2.4.3 Diskussion der Satelliten III-DNA

Die Resultate, die durch den Abbau mit Restriktionsnukleasen erhalten wurden, stellen die Meerschweinchen Satelliten III-DNA in die gleiche Kategorie wie die Mäuse Satelliten-DNA (35), die α -Satelliten-DNA der afrikanischen grünen Meerkatze (41) und der Satelliten III-DNA aus *Drosophila melanogaster* (39,40). In der

Meerschweinchen Satelliten-DNA kommt als neues Element hinzu, daß es auf jeder repetitiven Einheit zwei potentielle Spaltstellen (α und β) gibt. Die statistische Analyse der Spaltpmuster zeigt, daß für die Restriktionsnuklease Bsu die Spaltwahrscheinlichkeit 60 - 70 % beträgt und darin kein Unterschied zwischen α - und β -Spaltstellen besteht. Diese Ergebnisse sind für Überlegungen über die Entstehung dieser Satelliten-DNA von Bedeutung. Am einfachsten sind sie durch die Annahme zu erklären, daß die Satelliten III-DNA einmal an allen α - und β -Positionen Spaltstellen für Bsu hatte und davon durch einen Prozeß, der mit der Statistik in Einklang steht, im Verlauf der Evolution 30 - 40 % verlor. Da die Abstände zwischen den beiden Spaltstellen genau $1/4$ und $3/4$ der repetitiven Einheit betragen, ist es außerdem möglich, daß diese Einheit in sich selbst wiederum repetitiv ist und durch Amplifikation eines 4 mal kleineren DNA-Fragments, das eine Spaltstelle für Bsu enthielt, entstanden sein könnte.

Im Gegensatz zu der gleichmäßigen Verteilung der Bsu-Spaltstellen auf dem größten Teil der Satelliten III-DNA ist die unterschiedliche Verteilung und die Beschränkung der Spaltstellen für jede der anderen Restriktionsnukleasen auf einen minoren Teil der DNA durch die aufeinanderfolgenden Prozesse von Amplifikation und Divergenz allein nicht zu erklären. Ebenso wenig würde dadurch die Entstehung der höheren Multimeren beim Abbau der Satelliten III-DNA mit Bsu verständlich. Zur Erklärung dieses Bsu-Segmentes und der Spaltpmuster der anderen Restriktionsnukleasen müssen zusätzliche Evolutionsmechanismen angenommen werden. So könnte die Anhäufung der Spaltstellen für jede dieser Restriktionsnukleasen auf verschiedenen DNA-Segmenten durch lokale Amplifikation (35) und/oder ungleiches Crossing over (36) erklärt werden.

2.5 Abschlußdiskussion der Meerschweinchen Satelliten-DNAs

Die vorliegende Analyse der drei Satelliten-DNAs aus Meerschweinchen mit Hilfe von Restriktionsnukleasen zeigt große Unterschiede dieser DNA-Komponenten auf. Es war bekannt, daß die Satelliten II- und III-DNA in den Fingerprintanalysen der Oligopyrimidine sehr ähnlich sind (42,43). Das hatte zu der Interpretation

Anlaß gegeben, daß diese beiden Satelliten möglicherweise aus einer gemeinsamen DNA hervorgegangen sein könnten (42,43). Es war daher überraschend, daß die beiden Komponenten ein so unterschiedliches Verhalten gegen Restriktionsnukleasen zeigten. Die Satelliten II-DNA war gegen Abbau größtenteils resistent, während die Satelliten III-DNA durch beinahe alle Nukleasen in eine regelmäßige Serie von Fragmenten gespalten wurde. Es muß aber daran erinnert werden, daß in den Abbaumustern der Restriktionsnukleasen andere Strukturparameter der DNA aufgezeigt werden als in der Analyse der Oligopyrimidine. Aufgrund der spezifischen Erkennungssequenz geben die Restriktionsnukleasen Auskunft über die Sequenzhomogenität einer repetitiven DNA und Periodizitäten höherer Ordnung. In diesen Struktureigenschaften können aber auch entwicklungsgeschichtlich nahe verwandte Satelliten-DNAs sehr unterschiedlich sein. Die mit Hilfe von Restriktionsnukleasen gewonnenen Ergebnisse weisen auf eine hohe Strukturhomogenität in der Satelliten II-DNA und lassen auf eine größere Heterogenität in der Satelliten III-DNA schließen. Diese Deutung steht im Einklang mit früheren Befunden, daß die Satelliten II-DNA bei einem um eine Größenordnung niedrigeren Cot-Wert renaturiert als die Satelliten III-DNA (9). Ebenso weist das Schmelzverhalten von reassozierten Komplexen auf eine große Sequenzhomogenität in der Satelliten II-DNA hin (9). Als mögliche Erklärung für die Ähnlichkeit der Oligopyrimidine der beiden DNAs und der größeren Sequenzheterogenität in der Satelliten III-DNA gibt es die Hypothese, daß die Satelliten III-DNA entwicklungsgeschichtlich die ältere repetitive DNA-Sequenz sei (42) und daher einen höheren Grad an Mutationen aufweise. Zu einem späteren Zeitpunkt der Evolution wurde aus der Satelliten III-DNA eine kurze DNA-Sequenz ausgeschnitten und zu der Satelliten II-DNA hochamplifiziert (42).

Wie die Abbaumuster der Nuklease-Spaltungen gezeigt haben, ist die Sequenz der Satelliten I-DNA sehr heterogen. Dieser Befund stimmt mit früheren Ergebnissen aus Oligopyrimidinanalysen (15) und Renaturierungskinetiken (9) überein und könnte darauf hindeuten, daß diese Satelliten-DNA entwicklungsgeschichtlich sehr früh entstanden ist. In diesem Zusammenhang sind die Befunde interessant, daß die Meerschweinchen Satelliten I-DNA und der HS- α -Satellit der Känguruh-Ratte in den Fingerprintanalysen der Oligopyri-

midine sehr ähnlich sind und beide Satelliten-DNAs auf eine gemeinsame Ursequenz zurückgeführt werden können (14), obwohl diese beiden Nagetierarten entwicklungsgeschichtlich weit auseinander liegen. Diese Ergebnisse veranlaßten zu der Hypothese (14), daß die Satelliten-DNA-Sequenzen in den einzelnen Arten nicht de novo entstehen, sondern daß ein Vorrat an gemeinsamen repetitiven Ursequenzen existiert, aus dem bestimmte Komponenten in den einzelnen Spezies im Verlauf der Evolution zu Satelliten-DNAs hochamplifiziert werden.

3.0 Analyse der Chromatinstruktur mit Hilfe von DNAase II

An den Veränderungen unserer Vorstellungen über die Chromatinstruktur sind Nukleasespaltungen maßgeblich beteiligt. Insbesondere die Versuche mit Micrococcus-Nuklease und DNAase I haben das Verständnis vom Aufbau des Chromatins mit geprägt. Im Vergleich zu den beiden Nukleasen wurde die DNAase II nur in wenigen Arbeiten zur Analyse von Chromatin herangezogen (44-48). Zur Charakterisierung dieser Nuklease seien folgende Punkte angeführt. Mit dem Molekulargewicht von 26 500 (49) liegt die DNAase II zwischen der Micrococcus-Nuklease (MG 17 000 Ref. 50,51) und der DNAase I (MG 31 000 Ref.52). Im Unterschied zu den anderen Nukleasen benötigt die DNAase II keine divalenten Kationen, wird aber durch solche Ionen in ihrer Aktivität nicht wesentlich beeinflusst. Weiter hat die DNAase II die Eigenschaft, sowohl Doppelstrang- wie Einzelstrangbrüche in die DNA einzuführen (53). Und obwohl das pH-Optimum dieser Nuklease etwa bei pH 5 liegt, ist ihre Aktivität auch unter neutralem pH-Wert noch verhältnismäßig hoch (53,54).

3.1 Abbau von Chromatin im Zellkern mit DNAase II

Zellkerne aus Mäuselebern wurden in 10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM PMSF aufgenommen und mit Micrococcus-Nuklease bzw. DNAase II inkubiert, die DNA isoliert und in der Gelelektrophorese analysiert. Dabei zeigte sich, daß das Abbaumuster nach DNAase II-Verdauung nicht dem durch die Micrococcus-Nuklease erzeugten entsprach. Wie durch Coelektrophorese mit den Eco RII-Fragmenten der Mäuse Satelliten-DNA ermittelt wurde, bilden die DNA-Bruchstücke aus dem DNAase II-Abbau eine Serie der ganzzahligen Vielfachen von ungefähr 100 Nukleotidpaaren. Unter den gleichen Versuchsbedingungen entsteht beim Abbau von Chromatin mit Micrococcus-Nuklease das bekannte Muster mit einer Periodizität von ungefähr 200 Nukleotidpaaren. Ein exonukleolytischer Abbau der DNA-Fragmente, wie er für Micrococcus-Nuklease charakteristisch ist (Kap. 3.3), läßt sich beim Abbau von Mäuseleberkernen mit DNAase II nicht beobachten. Außerdem wird bei ausgedehntem Abbau keine der DNA-Banden besonders intensiv- wie etwa die Bande der Frag-

mente aus den monomeren Nukleosomen beim Abbau mit *Micrococcus*-Nuklease- und im Bereich von 100 Nukleotidpaaren sind mehrere schwache Banden zu sehen.

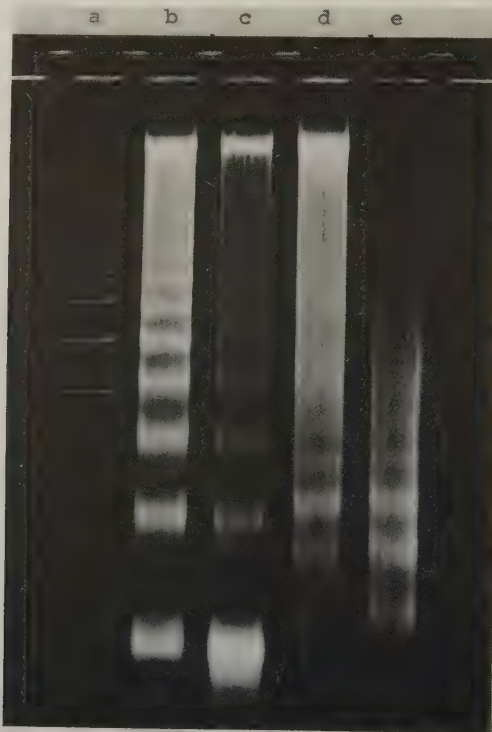


Abb. 10: Abbau von Mäuseleberkernen mit DNAase II

Mäuseleberkerne wurden in 10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM PMSF und 1 mM CaCl_2 1 Std. bei 37°C mit *Micrococcus*-Nuklease inkubiert (b 7 Einheiten /ml, c 25 Einheiten /ml). Ein Teil der Kerne wurde mit DNAase II (d 125 Einheiten /ml, e 250 Einheiten /ml) in 10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM PMSF 1 Std. bei 37°C abgebaut. Die DNA wurde aus den Abbauprodukten isoliert und je 5 µg in einem 1,8% Agarose-Plattengel elektrophoresiert. Als Molekulargewichtsreferenzen dienten in a die Eco RII-Fragmente der Mäuse Satelliten-DNA (35).

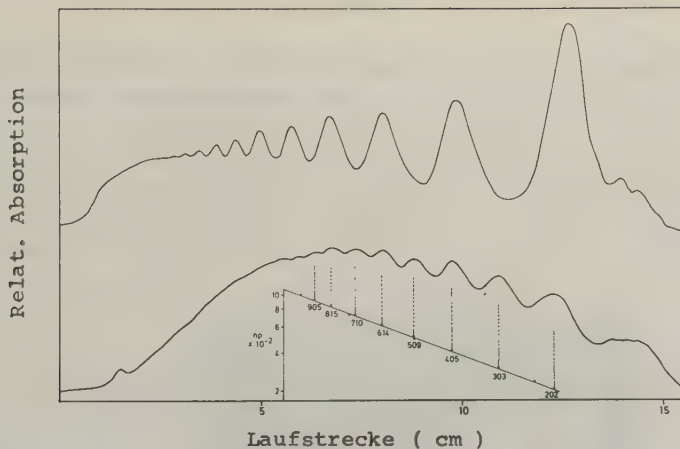


Abb. 11: 100-Nukleotidpaar-Periodizität beim Abbau von Chromatin mit DNAase II

Mäuseleberkerne wurden mit Micrococcus-Nuklease (15 Einheiten/ml) bzw. DNAase II (250 Einheiten/ml) wie unter Abbildung 10 beschrieben inkubiert und analysiert. Hier sind die Densitogramme der durch Micrococcus-Nuklease (obere Kurve) bzw. DNAase II gebildeten DNA-Fragmente zu sehen. Die Größenbestimmung der Bruchstücke nach DNAase II-Abbau beruht auf Coelektrophorese dieser Fragmente mit den Eco RII-Fragmenten der Mäuse Satelliten DNA (35) als Molekulargewichtsreferenzen (eingezeichnete Eichgerade).

Um auszuschließen, daß die Periodizität von 100 Nukleotidpaaren nur unter ganz bestimmten Bedingungen auftritt und möglicherweise von einer verunreinigenden Aktivität im DNAase II-Präparat herührt, wurde eine Reihe verschiedener Inkubationsbedingungen untersucht. Die Intensität der Banden ist zwar nach Abbau bei niedrigen Ionenstärken am größten, doch tritt das Muster auch dann auf, wenn die Kerne in Gegenwart von EDTA oder CaCl_2 bis zu einer Konzentration von 5 mM oder in 150 mM NaCl mit DNAase II inkubiert werden. Noch höhere CaCl_2 - oder EDTA-Konzentrationen inhibieren den Abbau sehr stark. Auch eine Veränderung des pH-Wertes im Bereich zwischen 4.0 und 7.5 bei Verwendung von 10 mM Acetat- bzw. Phosphatpuffer führt nicht zu einem anderen Abbaumuster. Ebenso wurde es mit einer Reihe von DNAase II-Chargen gefunden, darunter auch mit einer, die im Labor von G. Bernardi hergestellt worden war (53). Proteaseaktivität während des Abbaus von Chromatin mit DNAase II, als eine mögliche Quelle von Artefakten, konnte

durch Histonanalysen von inkubierten und uninkubierten Proben auf SDS-Polyacrylamid-Gelen (55) ausgeschlossen werden. Die Möglichkeit, daß das hier entdeckte 100-Nukleotidpaar-Muster durch weitergehenden Abbau aus einem zunächst auftretenden 200-Nukleotidpaar-Muster hervorgehen könnte, wurde durch die Analyse des zeitlichen Verlaufs des Chromatinabbaus mit DNAase II ausgeschlossen.

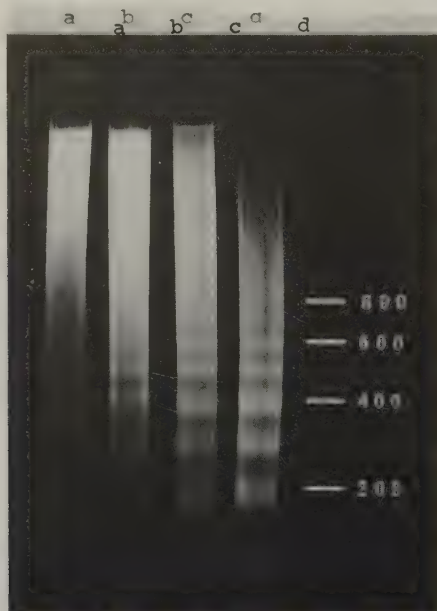


Abb. 12: Zeitlicher Verlauf des Abbaus von Chromatin in Mäuseleberkernen mit DNAase II

Mäuseleberkerne wurden mit DNAase II (120 Einheiten/ml) in 10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM PMSF bei 37°C 5(a), 8(b), 11(c), 18(d) min. inkubiert, die DNA isoliert und je 5 µg in einem 1.8% Agaröse-Plattengel analysiert. Die am rechten Gelrand eingezeichnete Molekulargewichtsskala (in Nukleotidpaaren) basiert auf Coelektrophorese der Abbauprodukte mit den Eco RII-Fragmenten der Mäuse Satelliten-DNA (35).

Diese Analyse zeigt, daß das 100-Nukleotidpaar-Muster zu erkennen ist, sobald definierte Banden zu sehen sind, und daß zu keinem Zeitpunkt der Abbaukinetik die Banden des 200-Nukleotidpaar-Registers intensiver sind. Daraus folgt, daß die Zugänglichkeit

der DNA im Chromatin für die DNAase II jeweils im Abstand von 100 Nukleotidpaaren deutlich erhöht sein muß.

Es wäre denkbar, daß durch die Spaltung mit DNAase II eine neue Chromatinuntereinheit freigesetzt wird, deren Größe der Hälfte eines Nukleosoms entspräche. Eine einfache Methode, um dieses zu überprüfen, ist die Saccharosegradienten-Zentrifugation (56,57), mit deren Hilfe Nukleosomen als Deoxyribonukleoprotein-Partikel isoliert werden können. Würden bei der DNAase II-Behandlung von Chromatin solche Untereinheiten mit 100, 200, 300 usw. Nukleotidpaaren DNA entstehen, müßte man diese als diskrete Zonen im Saccharosegradienten auftrennen können. Wie in Abbildung 13 gezeigt wird, sind in dem Gradienten aber nur Partikel zu sehen, die in ihrem Sedimentationsverhalten denen entsprechen, die beim Abbau von Chromatin mit Micrococcus-Nuklease erhalten werden.

Auffallend an diesem Gradientenprofil der DNAase II-Abbauprodukte ist allerdings die quantitative Verteilung des Materials. So findet man auch nach ausgedehntem Abbau der Mäuseleberkerne mit DNAase II immer wenig Material in der Monomerregion, und die Zonen der geradzahligen oligomeren Nukleosomen sind prominenter als jene der ungeradzahligen (Abb. 13A). Bei der Analyse der DNA aus den Gradientenfraktionen in einem Agarosegel sieht man, daß alle Fraktionen DNA enthalten, die im 100-Nukleotidpaar-Raster gespalten worden ist, wobei das schnell sedimentierende Material nicht nur die hohen Multimeren enthält, sondern das ganze Spektrum vom 100-Nukleotidpaar-Fragment an aufwärts. Die Interpretation dieses Befundes ist, daß die DNAase II die DNA zwischen den Nukleosomen spaltet und daß die zweite Spaltstelle, bezogen auf die DNA, ungefähr in der Mitte des Nukleosoms liegen muß. Die Spaltung des intranukleosomalen DNA führt aber offensichtlich nicht zur Dissoziation des Nukleosoms.

Die geringe Menge an monomeren Nukleosomen und der höhere Anteil an Dimeren und Tetrameren deutet darauf hin, daß diese Nukleosomen eine relativ große Tendenz haben, im Zweierverband assoziiert zu bleiben, auch wenn die DNA internukleosomal gespalten worden ist. Da dem Histon H1 eine wesentliche Rolle bei der Aggregation des Chromatins zugeschrieben worden war (31), lag die Vermutung

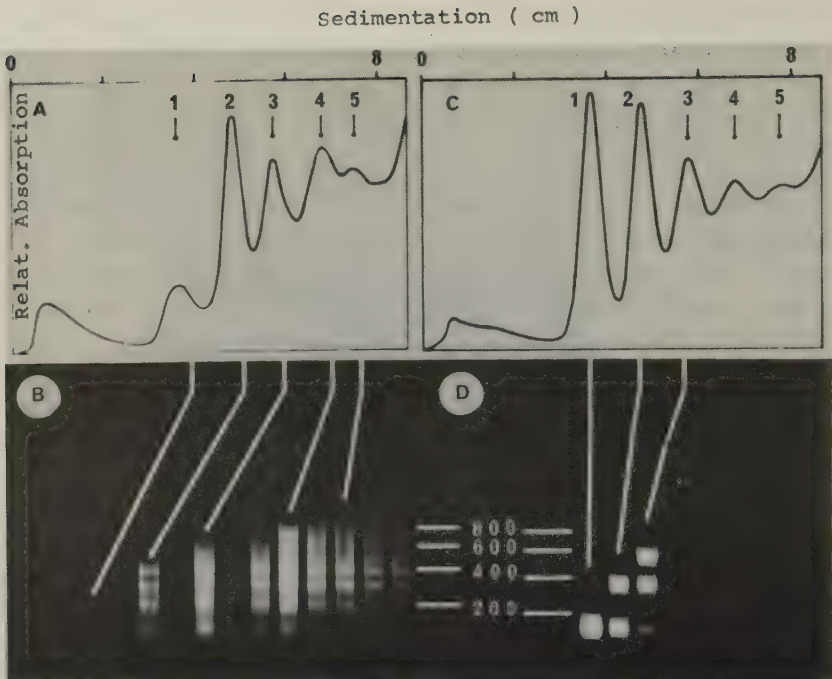


Abb. 13: Saccharosegradienten-Zentrifugation der Abbauprodukte von Mäuseleberkernen mit DNAase II bzw. Micrococcus-Nuklease

Mäuseleberkerne wurden mit DNAase II (120 Einheiten/ml) bzw. Micrococcus-Nuklease (10 Einheiten/ml) wie unter Abbildung 10 beschrieben inkubiert. Das in 0.2 mM EDTA lösliche Chromatin (siehe Kap. 5.6) wurde auf einen isokinetischen Saccharosegradienten ($C = 5\%$, Partikeldichte = 1.51, Referenz 59) gegeben, der 1 mM EDTA pH 7.0 enthielt, und im Beckman SW 41-Rotor bei 4°C 13 Std. mit 38 000 Upm zentrifugiert. Der Gradient wurde von unten nach oben ausgepumpt (59) und die Absorption bei 260 nm in einer Durchflußzelle gemessen. A zeigt das Gradientenprofil der DNAase II-Abbauprodukte, C dasjenige der Abbauprodukte durch Micrococcus-Nuklease. Die Zahlen 1, 2 usw. über dem Gradientenprofil bezeichnen die monomeren, dimeren usw. Nukleosomenfraktionen. Die DNA aus den einzelnen Gradientenfraktionen wurde isoliert und auf 1.8% Agarose-Plattengelen analysiert (B bzw. D). Die eingezeichnete Molekulargewichtsskala (in Nukleotidpaaren) basiert auf Coelektrophorese mit den Eco RII-Fragmenten der Mäuse Satelliten-DNA als Molekulargewichtsreferenzen (35).

nahe, daß das Histon H1 auch für dieses Aggregationsverhalten der Nukleosomen mit verantwortlich sein könnte. Um dies zu untersuchen, wurde das Histon H1 nach DNAase II-Abbau durch Behandlung mit 0.6 M NaCl vom Chromatin abdissoziiert (21) und das so behandelte Material auf einen Saccharosegradienten aufgetragen.

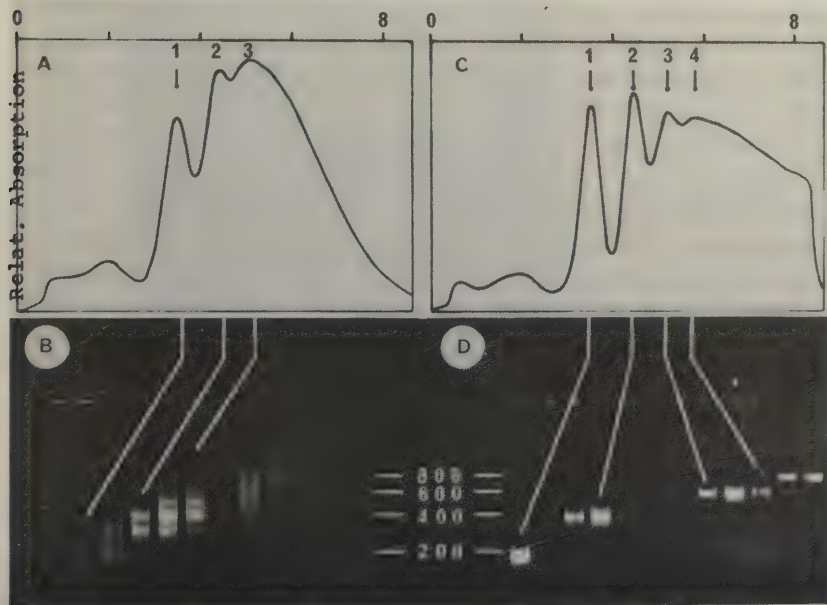


Abb. 14: Saccharosegradienten-Zentrifugation der Abbauprodukte von Mäuseleberkernen mit DNAase II bzw. Micrococcus-Nuklease nach Behandlung mit 0.6 M NaCl

Zu dem nach Nukleasebehandlung in 0.2 mM EDTA löslichen Chromatin (Material wie in Abbildung 13 beschrieben) wurde NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0.6 M zugesetzt und dieses so behandelte Chromatin im Saccharosegradienten unter gleichen Bedingungen wie unter Abbildung 13 beschrieben zentrifugiert. A und B zeigt die Analyse der DNAase II-Abbauprodukte, C und D die der Micrococcus-Nuklease. Die Eichskala basiert auf Coelektrophorese mit den Eco RII-Fragmenten aus Mäuse Satelliten-DNA (35) und ist in Nukleotidpaaren angegeben.

Aus dem Gradientenprofil (14A) ist zu entnehmen, daß unter diesen Bedingungen sehr viel mehr Material im Bereich der monomeren Nu-

kleosomen sedimentiert. Die Gelanalyse der DNA aus den Gradientenfraktionen (14B) zeigt, daß die Aggregation zwischen den Nukleosomen stark reduziert ist. Die Integrität der Nukleosomen bleibt aber auch nach Behandlung der DNAase II-Abbauprodukte mit 0.6 M NaCl erhalten, d.h. es gibt kein Anzeichen für das Entstehen von Nukleosomen halber Größe, obwohl die DNA eine interne Spaltung aufweist. Betrachtet man die relativen Mengen in den einzelnen Nukleosomenfraktionen, so hat sich das Gradientenprofil des Chromatins aus dem Micrococcus-Nuklease-Abbau nach Behandlung der Spaltprodukte mit 0.6 M NaCl nicht wesentlich verändert (14C). Wie die Analyse der DNA aus den Gradientenfraktionen zeigt (14D), ist aber durch die Entfernung von Histon H1 eine allerdings geringere Tendenz der Nukleosomen zur Aggregation völlig aufgehoben. Beiden gezeigten Gradienten (14A und 14C) ist gemeinsam, daß die Nukleosomenfraktionen nach der Behandlung mit 0.6 M NaCl langsamer sedimentieren, einestells aufgrund des Verlustes an Histon H1 (27), andererseits möglicherweise aber auch aufgrund von Strukturänderungen innerhalb der Partikel als Folge der Salzbehandlung.

3.2 Abbau von EDTA-behandeltem Chromatin und isolierten oligomeren Nukleosomen mit DNAase II

Um die Einflüsse der Ionenbedingungen auf den Abbau des Chromatins durch die DNAase II besser kontrollieren zu können, sollte ein erster Schritt zu einem diesbezüglich definierteren System gemacht werden. Dazu wurden die Kerne aus Mäuselebern mehrmals in 80 mM NaCl, 20 mM EDTA pH 6.3 (58) suspendiert und das dabei entstandene Chromatingel in 10 mM Tris-HCl pH 7.0 aufgenommen und mit DNAase II bzw. Micrococcus-Nuklease inkubiert. Dabei zeigte sich, daß der Abbau dieses Chromatins mit DNAase II stark von den Ionenbedingungen abhängig ist, unter denen die Inkubation erfolgt.

Wie die Gelelektrophorese zeigt, erhält man bei Inkubation in 10 mM Tris-HCl pH 7.0 ein 200-Nukleotidpaar-Abbaumuster (Abb. 15c), ähnlich dem, das beim Abbau mit Micrococcus-Nuklease erhalten wird (15b). Führt man die Inkubation in Gegenwart von divalenten (15d) oder monovalenten Kationen (15e) aus, erscheint, über höherem Un-

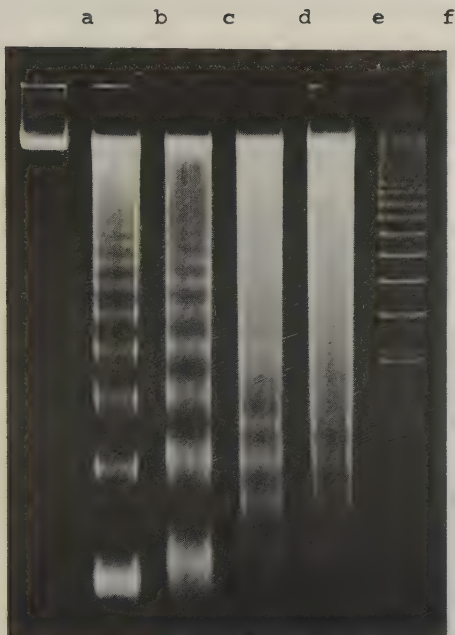


Abb. 15: Abhängigkeit des Abbaus von Mäuseleberchromatin mit DNAase II von den Ionenbedingungen

Das durch EDTA-Behandlung (Kap. 5.6) hergestellte Mäuseleberchromatin wurde in 10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM PMSF, 1 mM CaCl_2 a ohne Nuklease, b mit Micrococcus-Nuklease (25 Einheiten/ml), d mit DNAase II (500 Einheiten/ml) 40 min. bei 37°C inkubiert. Die Inkubation mit DNAase II wurde auch in Abwesenheit von CaCl_2 (c) bzw. in Gegenwart von 150 mM NaCl anstelle von 1 mM CaCl_2 ausgeführt (e). Die DNA wurde isoliert und je 5 µg in einem 1.8% Agarose-Plattengel elektrophoresiert. In f sind die Eco RII-Fragmente der Mäuse Satelliten-DNA als Molekulargewichtsreferenzen zu sehen (35).

tergrund zwar, wieder das 100-Nukleotidpaar-Muster. Bei den gleichen Ionenbedingungen, unter denen der Übergang vom 200-Nukleotidpaar- zum 100-Nukleotidpaar-Abbaumuster beobachtet wird, erfolgt eine starke Kontraktion des Chromatingels wie sie in Referenz 31 beschrieben wurde.

Um entscheiden zu können, ob die 200-Nukleotidpaar-Periodizität, die beim Abbau von Chromatin mit DNAase II auftritt, durch Spaltung der DNA im intra- oder internukleosomalen Bereich entstanden war, wurden die Abbauprodukte in einem Saccharosegradienten analysiert. Das erhaltene Nukleosomenprofil und das Sedimentationsverhalten der einzelnen Nukleosomenfraktionen zeigen, ver-

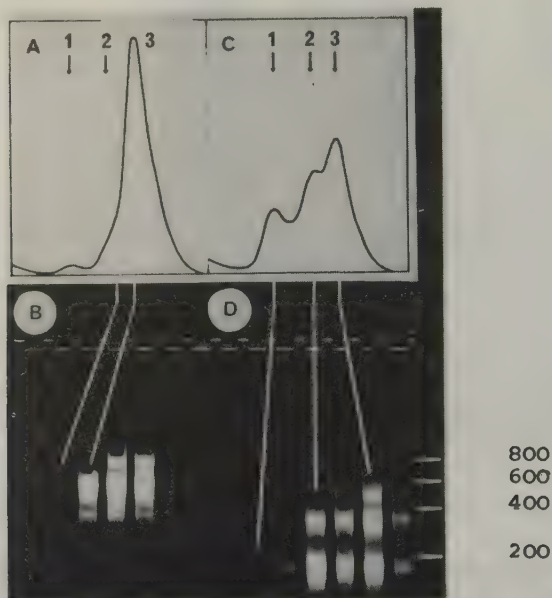


Abb. 16: Abbau von isolierten trimeren Nukleosomen mit DNAase II

Mäuseleberkerne wurden mit *Micrococcus*-Nuklease inkubiert und das in 0.2 mM EDTA lösliche Chromatin (Kap. 5.6) in einem Saccharosegradienten, wie unter Abbildung 13 beschrieben, zentrifugiert. Die den trimeren Nukleosomen entsprechende Fraktion wurde aus dem Gradienten isoliert, in einer Amicon Druckdialyse-Apparatur konzentriert. Dann wurde in 10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM PMSF 5 min. bei 37°C ohne Nuklease (A,B) bzw. mit DNAase II (90 Einheiten/ml) (C,D) inkubiert, die Abbauprodukte wieder auf einen Saccharosegradienten gegeben (59) und im Beckman SW 56-Rotor bei 4°C 14 Std. mit 32 000 Upm zentrifugiert.

In A und C sind die Gradientenprofile, in B und D die Gelanalyse der DNA aus den bezeichneten Gradientenfraktionen zu sehen. Die Zahlen 1, 2, 3 über dem Gradientenprofil bezeichnen die monomeren, dimeren und trimeren Nukleosomenfraktionen. Die Eichskala basiert auf Coelektrophorese mit den Eco RI-Fragmenten der Mäuse Satelliten-DNA (35) und ist in Nukleotidpaaren angegeben.

glichen mit dem Gradientenprofil der Micrococcus-Nuklease-Abbauprodukte, daß die Spaltung der DNA zwischen den Nukleosomen erfolgt sein mußte (Versuche nicht gezeigt). Um die Spaltregion der DNAase II im mit EDTA behandelten Chromatin relativ zu der für die Micrococcus-Nuklease näher zu definieren, wurden trimere Nukleosomen aus einem Micrococcus-Nuklease-Abbau isoliert, in 10 mM Tris-HCl pH 7.0 mit DNAase II abgebaut und die Abbauprodukte wieder auf einen Saccharosegradienten aufgetragen.

Wie Abbildung 16 zeigt, entstehen unter diesen Bedingungen dimer- und monomere Nukleosomen, und die darin enthaltene DNA hat eine Größe von ungefähr 400 bzw. 200 Nukleotidpaaren. Das bedeutet, daß die Spaltregionen für die Micrococcus-Nuklease und die DNAase II entweder ganz oder zumindest teilweise überlappen. Um zu untersuchen, ob das Abbaumuster von trimeren Nukleosomen ebenfalls von den Ionenbedingungen abhängt, oder ob der Übergang vom 200-Nukleotidpaar- zum 100-Nukleotidpaar-Abbaumuster an größere Struktureinheiten gebunden ist, wurde vor der Inkubation mit DNAase II zu einer Fraktion mit überwiegend trimeren Nukleosomen CaCl_2 zugegeben.

Die Gelanalyse in Abbildung 17 zeigt, daß das DNA-Abbaumuster in Gegenwart von CaCl_2 völlig andersartig ist (17D) als in Gegenwart von EDTA (17C). Es sind zwar Banden bei ungefähr 200, 400 und 600 Nukleotidpaaren DNA zu sehen, aber zusätzlich auch DNA-Fragmente, die dazwischen liegen, mit einer Andeutung von Banden bei ungefähr 300 und 500 Nukleotidpaaren. Das erhaltene Abbaumuster ist aber nicht ausreichend definiert, um es klar dem 100-Nukleotidpaar-Register zuordnen zu können. Ähnlich waren die Resultate, die mit anderen Nukleosomenfraktionen erhalten wurden, zum einen mit den Tetrameren, zum anderen mit den Fraktionen von 5-12 Einheiten. Immer war ein deutliches 200-Nukleotidpaar-Abbaumuster in Abwesenheit von CaCl_2 bzw. in Gegenwart von EDTA zu sehen und ein hoher Untergrund mit Andeutungen von Zwischenbanden bei ungefähr 300, 500 usw. Nukleotidpaaren, wenn divalente Kationen für die Inkubation zugegeben wurden (Versuche nicht gezeigt).

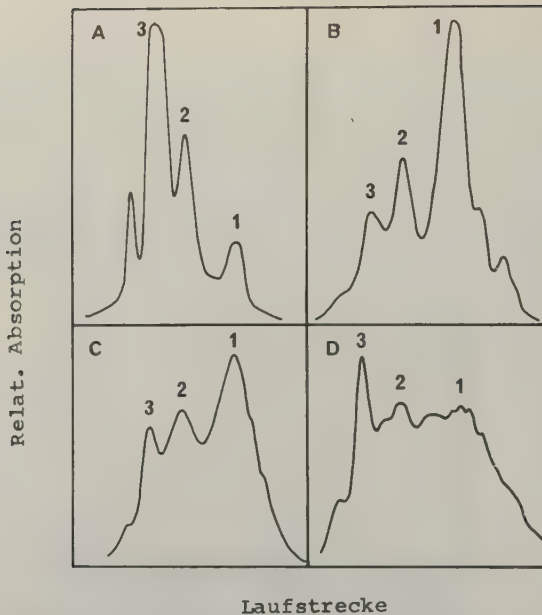


Abb. 17: Einfluß der Spaltbedingungen auf den DNAase II-Abbau einer trimeren Nukleosomenfraktion

Mäuseleberkerne wurden mit Micrococcus-Nuklease inkubiert und das in 0.2 mM EDTA lösliche Chromatin (Kap. 5.6) wie unter Abbildung 13 beschrieben zentrifugiert mit dem einzigen Unterschied, daß der Saccharosegradient anstelle von 1 mM EDTA 1 mM Tris-HCl pH 7.0 enthielt. Die den trimeren Nukleosomen entsprechende Fraktion wurde aus dem Gradienten isoliert und, ohne Rezentrifugation, in 10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM CaCl_2 , **A** ohne Nuklease, **B** mit Micrococcus-Nuklease (5 Einheiten/ml), **D** mit DNAase II (200 Einheiten/ml) 5 min. bei 37°C inkubiert. In **C** wurde in Gegenwart von 1 mM EDTA pH 7.0 anstelle von 1 mM CaCl_2 mit DNAase II (40 Einheiten/ml) 5 min. bei 37°C abgebaut. Die DNA wurde aus den Proben isoliert und je 5 µg in einem 1.8 % Agarose-Plattengel elektrophoresiert. In der Abbildung sind die Densitogramme der Abbaumuster zu sehen. Die Zahlen 1, 2 bzw. 3 bezeichnen die DNA-Banden der Fragmente von ungefähr 200, 400 bzw. 600 Nukleotidpaaren.

3.3 Einfluß des Histons H1 auf den Chromatinabbau mit DNAase II bzw. Micrococcus-Nuklease

Das Histon H1 unterscheidet sich in mehrfacher Hinsicht von den anderen vier in Eukaryonten hauptsächlich vorkommenden Histonarten (H2A, H2B, H3, H4). Das Molekulargewicht von H1 ist ungefähr 1.5-2 mal größer als das der übrigen Histonarten (21), und keines der anderen Histone weist eine so große Variabilität in der Aminosäuresequenz auf wie das Histon H1 (60). Seiner Struktur nach besteht H1 aus einem kurzen, basischen N-terminalen Teil, einer apolaren Region in der N-terminalen Hälfte des Moleküls und einem langen, basischen C-terminalen Teil (21,60). Der Unterschied zu den übrigen Histonen wird auch daraus ersichtlich, daß das Histon H1 in der Nukleosomen-Kernstruktur des Chromatins nicht enthalten ist und daß es nicht mit den anderen Histonen, sondern möglicherweise nur mit der DNA in Wechselwirkung tritt (61). Untersuchungen deuten darauf hin, daß H1 für die durch Salz induzierte Kontraktion des Chromatins notwendig ist und keine Kontraktion mehr erfolgt, wenn dieses Histon aus dem Chromatin abdissoziiert wurde (61). Der Abbau von Chromatin aus niederen Eukaryonten durch Micrococcus-Nuklease gab weitere Hinweise auf Funktionen von Histon H1. So konnten die kürzeren Nukleotidpaar-Periodizitäten in den Abbaumustern von Chromatin aus *Aspergillus nidulans* (154 Nukleotidpaare) (62) bzw. *Neurospora crassa* (171 Nukleotidpaare) (63) zu einem kleineren (62) bzw. weniger basischen Histon H1 (63) in Beziehung gebracht werden. Die größere Nukleotidpaar-Periodizität in den Abbaumustern von Hühner-Erythrozytenchromatin (212 Nukleotidpaare) (64) verglichen mit der Periodizität in Hühner-Leberchromatin (200 Nukleotidpaare) (64) wurde als eine Folge des stärker basischen Histons H5 in Erythrozyten diskutiert, das dort einen Großteil des Histons H1 ersetzt (64). Bei ausgedehntem Abbau mit Micrococcus-Nuklease tritt jedoch bei allen bisher untersuchten Chromatinarten ein DNA-Fragment von ungefähr 140 Nukleotidpaaren Größe auf (27,62-70). Dieses Fragment wird dadurch erklärt, daß es stärker mit dem Histonkomplex des Nukleosoms, d.h. dem Nukleosomenkern assoziiert ist und dadurch gegen weiteren Angriff der Nuklease besser geschützt wird.

Wie diese Befunde zeigen, spricht vieles dafür, daß das Histon H1

auf den Abstand zwischen den Nukleosomenkernen im Chromatin einen Einfluß hat, und daß die unterschiedlichen Periodizitäten der Chromatin-Abbaumuster aufgrund der Variabilität von Histon H1 (Größe, Basizität) erklärt werden können. Da das H1 innerhalb eines Organismus in mehreren Subfraktionen vorkommt (60), die z.B. in der SDS-Gelelektrophorese als diskrete Banden aufgetrennt werden können (71) (vergleiche auch Abbildung 21), wäre es nicht überraschend, wenn in den Abbaumustern des Chromatins aus einem Orga-

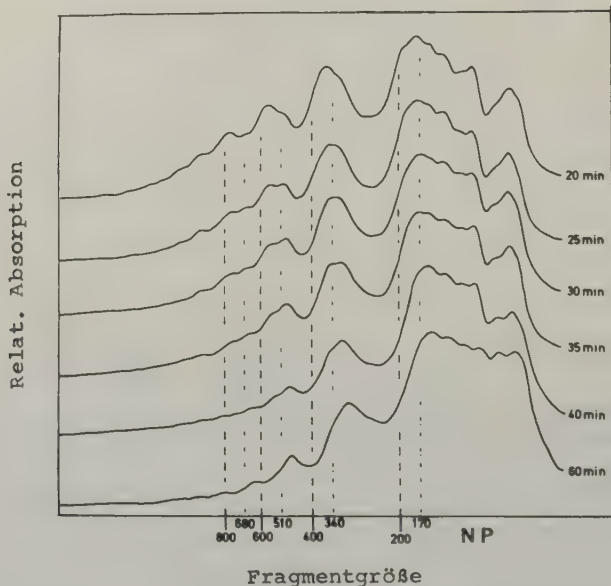


Abb. 18: Zwei Periodizitäten beim Abbau von Mäuseleberkernen mit *Micrococcus*-Nuklease

Mäuseleberkerne wurden mit *Micrococcus*-Nuklease (150 Einheiten/ml) in 10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM CaCl_2 bzw. dem in Ref.74 angegebenen Puffer A inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben abgenommen, die Reaktion mit EDTA gestoppt (Endkonzentration 2 mM), die DNA isoliert, in einem 2.5% Agarose-Plattengel elektrophoresiert. In der Abbildung sind die Densitogramme zu sehen. Die gestrichelten Linien geben die zwei zugrundegelegten Periodizitäten von 170 (-.-.) bzw. 200 Nukleotidpaaren (---) an (Abbildung 19).

Die Größe der Fragmente wurde durch Coelektrophorese mit den Eco RII-Fragmenten der Mäuse Satelliten-DNA (35) und den Bsu-Fragmenten der PM2-DNA (63) als Molekulargewichtsreferenzen bestimmt.

nismus verschiedene Periodizitäten gefunden werden könnten. Der im folgenden kurz beschriebene Versuch des Abbaus von Mäuseleberchromatin mit Micrococcus-Nuklease wäre möglicherweise durch eine solche Annahme von verschiedenen Periodizitäten zu deuten. Es wurde hier allerdings nicht versucht, eine Korrelation zwischen Periodizitäten und Histon H1-Subfraktionen in Mäuseleberchromatin herzustellen.

Wird Mäuseleberchromatin mit Micrococcus-Nuklease abgebaut und die DNA aus diesen Abbauprodukten durch Gelelektrophorese analysiert, so zeigt sich, daß bei ausgedehntem Abbau nicht nur DNA-Banden auftreten, die der 200-Nukleotidpaar-Periodizität zugeordnet werden können. Aus Abbildung 18 ist zu sehen, daß dem 200-Nukleotidpaar-Muster zusätzlich DNA-Banden überlagert sind, die im Verlauf des Chromatinabbaus stärker hervortreten. Durch Coelektrophorese dieser DNA-Abbaumuster mit Molekulargewichtsmarkern wurden die Größen der Fragmente bestimmt (Abb. 19). Aus der Größenbestimmung wird deutlich, daß das Bandenmuster nicht einfach durch exonukleolytischen Abbau der DNA-Fragmente erklärt werden kann. Mit dem Ausdruck "exonukleolytischer Abbau" ist der Befund gemeint, daß im Verlauf des Chromatinabbaus durch Micrococcus-Nuklease eine Verkürzung der DNA-Fragmente bis zu 60 Nukleotidpaaren eintritt, bezogen auf die Größe der Fragmente zu einem frühen Zeitpunkt des Abbaus (69,75). Als Ursache dafür wird eine Exonuklease-Aktivität der Micrococcus-Nuklease angenommen, die nach erfolgter internukleosomaler Spaltung die DNA von dieser Spaltstelle bis zum Nukleosomenkern hin abbaut. Dabei bleibt aber die Längendifferenz von 200 Nukleotidpaaren DNA zwischen monomeren und dimeren, sowie dimeren und trimeren Nukleosomen usw. erhalten (vergleiche Abb. 19: 140, 340, 540 usw. Nukleotidpaare).

Um die hier gemessenen DNA-Größen mit einem solchen Effekt erklären zu können, müßte man einerseits eine Überverdauung, d.h. eine Spaltung im Nukleosomenkern annehmen und gleichzeitig noch voraussetzen, daß die dimeren, trimeren und tetrameren Nukleosomen unterschiedlich weit überverdaut wurden, entsprechend einer Verkürzung der DNA in den dimeren, trimeren bzw. tetrameren Nukleosomen von 30, 60 bzw. 90 Nukleotidpaaren. Am einfachsten wären die Bandenmuster durch die Annahme zu erklären, daß dem Chromatin verschie-

	Gefundene Werte		200 NP-Raster	170 NP-Raster
			(bei 60 NP internucleos.)	(bei 30 NP internucleos.)
Monomere	—	—	200 → 140	170 → 140
Dimere	360	310	400 → 340	340 → 310
Trimere	560	480	600 → 540	510 → 480
Tetramere	760	650	800 → 740	680 → 650
Differenzen	200	170		

z.B. Trimere Nucleosomen

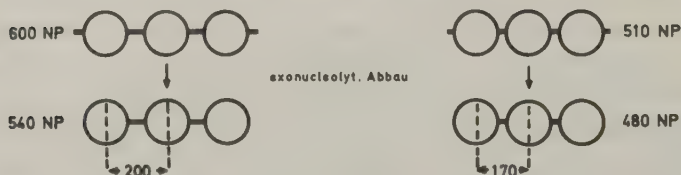


Abb. 19: DNA-Fragmente nach ausgedehntem Abbau von Mäuseleberkernen mit Micrococcus-Nuklease

Die Größen der bei ausgedehntem Abbau von Mäuseleberkernen mit Micrococcus-Nuklease auftretenden Fragmente wurden durch Coelektrophorese bestimmt und in der Tabelle aufgeführt. Wird ein 200-Nukleotidpaar-Raster und die Annahme von maximal 60 Nukleotidpaaren internukleosomal zugänglicher DNA zugrunde gelegt, sind die kleinsten erwarteten Werte für die DNA aus den dimeren, trimeren bzw. tetrameren Nucleosomen 340, 540 bzw. 740 Nukleotidpaare. Die gefundenen Werte von 360, 560 bzw. 760 Nukleotidpaaren DNA können eindeutig diesem Raster zugeordnet werden. Dagegen sind die ebenfalls gefundenen Werte von 310, 480 bzw. 650 Nukleotidpaaren DNA um 30, 60 bzw. 90 Nukleotidpaare kleiner als die kleinsten nach exonukleolytischem Abbau erwarteten Fragmente aus dem 200-Nukleotidpaar-Raster. Diese Werte können durch die Annahme eines zusätzlichen Nucleosomen-Rasters von 170 Nukleotidpaaren erklärt werden. Die Periodizität von 170 Nukleotidpaaren errechnet sich aus der Differenz zwischen den DNA-Fragmenten der dimeren und trimeren bzw. trimeren und tetrameren Nucleosomen.

In der Abbildung unten ist die Verkürzung der ursprünglichen Größe der DNA durch die Exonuklease-Aktivität im Verlauf des Chromatinabbaus mit Micrococcus-Nuklease anhand des trimeren Nucleosoms der beiden unterschiedlichen Raster schematisch dargestellt.

dene Periodizitäten zugrunde liegen, von denen sich eine zusätzliche aus den Größendifferenzen in den beiden überlagerten Bandenmustern bestimmen läßt (Abb.19). Solange es aber nicht gelingt,

Chromatinfractionen mit unterschiedlichen Periodizitäten getrennt voneinander zu analysieren, ist eine eindeutige Aussage zu verschiedenen Nukleosomen-Rastern in Mäuseleberchromatin nicht möglich (zum Vergleich auch Ref. 76,77,84).

3.3.1 Entfernung von Histon H1 aus dem Chromatin und "Rekonstitution" mit Histon H1

Es wurde schon erwähnt (Kap.3.2), daß unter den gleichen Bedingungen, unter denen beim Abbau von Chromatin mit DNAase II ein Übergang vom 200- zum 100-Nukleotidpaar-Abbaumuster festgestellt wird, auch eine Kontraktion des Chromatins stattfindet. Da das Histon H1 an dieser Kontraktion beteiligt ist (31), sollte zunächst H1 aus dem Chromatin entfernt werden, um den Einfluß dieses Histons auf die DNAase II-Abbaumuster zu untersuchen. Die H1-Entfernung aus Chromatin mit 0.6 M NaCl war für die geplanten Versuche nicht anwendbar, da die Extraktion unter diesen Salzbedingungen zu einer Veränderung in der Chromatinstruktur, und zwar speziell des Nukleosomenrasters, führt (Ref. 78 und eigene Versuche). Eine schonendere Methode zur Entfernung von H1 aus Chromatin, die nicht zu einer Veränderung im Nukleosomen-Raster führen sollte, wurde in den Referenzen 79 und 80 beschrieben. Die Autoren verwenden für die H1-Extraktion tRNA. Die tRNA bzw. der tRNA-H1-Komplex werden anschließend durch Säulenchromatographie oder Gradientenzentrifugation vom H1-frei gemachten Chromatin abgetrennt. Eine leicht modifizierte Form dieser Methode wurde für die folgenden Versuche angewendet. Das nach der Nuklease-Methode löslich gemachte Chromatin wurde mit tRNA inkubiert und danach in einem Saccharosegradienten zentrifugiert. Das H1-frei gemachte Chromatin trennt sich in zwei Fraktionen, eine im mittleren Drittel des Gradienten (Fraktion I: ungefähr 85% des Chromatins) und eine im Saccharosekissen (Fraktion II: ungefähr 15%).

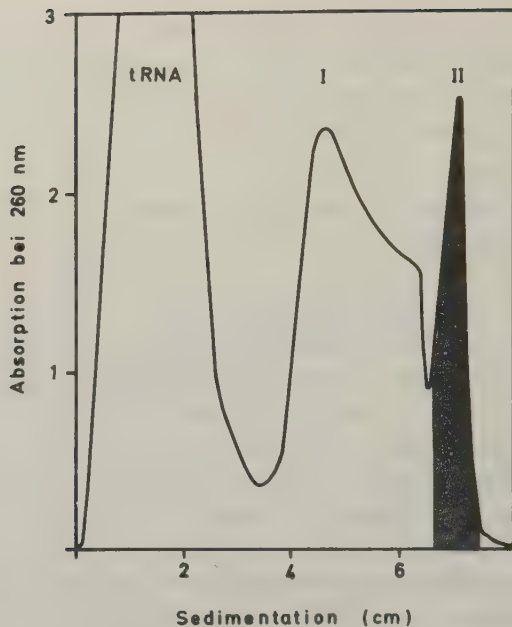


Abb. 20: Fraktionierung von H1-freiem Chromatin durch Saccharosegradienten-Zentrifugation

Das nach der tRNA-Methode H1-frei gemachte Chromatin (Kap. 5.7) wurde auf einem linearen 5-40 % (g/100 ml) Saccharosegradienten aufgetragen, der zusätzlich mit 3 ml 80 % Saccharose (g/100 ml) unterschichtet worden war. Das Auftragsvolumen betrug 1 ml der Inkubationslösung und enthielt 50 A_{260} Einheiten tRNA und 10 A_{260} Einheiten Chromatin. Die Salzkonzentration im Gradienten war 1 mM Tris-HCl pH 8.0. Zentrifugiert wurde im Beckman SW 41-Rotor bei 4°C für 22 Std. mit 34000 Upm. Die Abbildung zeigt das Absorptionsprofil bei 260 nm. Die tRNA sedimentiert im obersten Drittel des Gradienten und ist deutlich von den Chromatinfractionen I und II abgetrennt.

Die einzelnen Chromatinfractionen wurden durch SDS-Gelelektrophorese auf ihren Histongehalt hin analysiert, wobei kein Unterschied in der Histonzusammensetzung festgestellt werden konnte. Beide Fraktionen enthielten noch ungefähr 10 % der ursprünglichen Menge an Histon H1 und wiesen keine meßbaren Veränderungen im Verhältnis der anderen vier Histone zueinander auf.

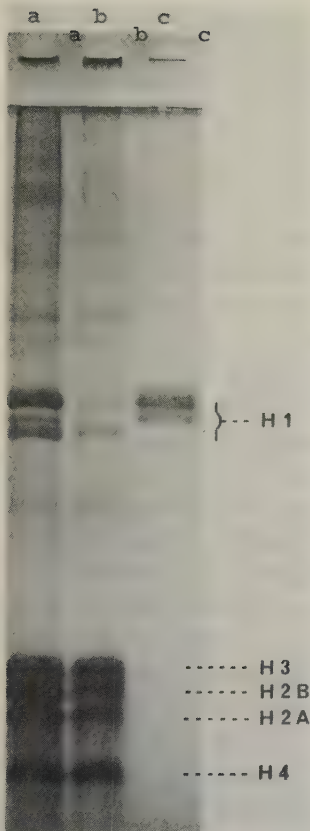


Abb. 21: Analyse der Histone nach der H1-Entfernung aus dem Chromatin

Je 1 A₂₆₀-Einheit Chromatin vor (a) und nach (b) H1-Extraktion wurde in SDS dissoziiert und die Proteine auf einem 13 % Polyacrylamid-SDS-Plattengel (55) elektrophoresiert. Die Histomengen wurden durch Densitometrieren bestimmt. Der Gehalt an Histon H1 im mit tRNA behandelten Chromatin betrug noch ungefähr 10 % bezogen auf die Menge H1 im unbehandelten Chromatin. In c wurden 0.02 A₂₃₀-Einheiten des aus Kalbsthymuschromatin extrahierten Histons H1 elektrophoresiert, das freundlicherweise von M. Steinmetz (78) zur Verfügung gestellt worden war.

Ein Vergleich der DNA aus den einzelnen Gradientenfraktionen durch Gelelektrophorese zeigte, daß die am schnellsten sedimentierende Chromatinfraktion II (schattierte Fläche in Abb. 20) fast ausschließlich DNA von einem Molekulargewicht größer als 3×10^6 enthielt, während in der anderen Chromatinfraktion überwiegend DNA mit niedrigerem Molekulargewicht enthalten war. Die Größenverteilung der DNA allein kann aber die Aufspaltung des Chromatins in zwei Zonen durch die Zentrifugation nicht erklären. Aus anderen Versuchen ist bekannt (73), daß das durch die NaCl-Extraktion H1-frei gemachte Chromatin im Glycerin-Gradienten in zwei Fraktionen sedimentiert. Durch elektronenmikroskopische Analysen konnten die Autoren zeigen, daß die langsamer sedimentierende Fraktion große Strecken von nukleosomenfreier DNA enthält, während

in der schnell sedimentierenden Fraktion alles Chromatin in Nukleosomen verpackt vorliegt. Es ist denkbar, daß das hier festgestellte unterschiedliche Sedimentationsverhalten des nach der tRNA-Methode H1-frei gemachten Chromatins auch durch solche Strukturunterschiede hervorgerufen wird.

Die Chromatinfraction II, die fast ausschließlich hochmolekulare DNA enthielt, wurde für die meisten der folgenden Versuche aus dem Gradienten isoliert, dialysiert und aufgeteilt. Der eine Teil wurde direkt als H1-freies Chromatin mit Micrococcus-Nuklease bzw. DNAase II abgebaut. Zum anderen Teil wurde aus Kalbsthymuschromatin isoliertes Histon H1 zugegeben (1 Histon H1 pro 200 Nukleotidpaare DNA) und das Chromatin danach mit Micrococcus-Nuklease bzw. DNAase II inkubiert. Wie die Gelelektrophorese zeigt, hat die H1-Extraktion auf die Abbaumuster durch die Micrococcus-Nuklease nur geringe Auswirkung (Abb. 22A). Eine Änderung in der 200-Nukleotidpaar-Periodizität ist nicht festzustellen. Charakteristisch für die Abbau-muster von H1-freiem Chromatin ist die relativ scharfe Bande bei 150-160 Nukleotidpaaren. Die Abbaugeschwindigkeit ist in H1-freiem Chromatin leicht erhöht, was mit der Theorie vereinbar ist, daß das Histon H1 im internukleosomalen Bereich des Chromatins lokalisiert ist (27) und die DNA dadurch im H1-haltigen Chromatin gegen den Angriff der Nuklease besser geschützt wird. Das zusätzlich auftretende Fragment von ungefähr 300 Nukleotidpaaren rührt von einer leichten Veränderung der Chromatinstuktur als Folge der Extraktion von Histon H1 her. Eine solche Veränderung, wie sie in starkem Ausmaß bei der Entfernung von Histon H1 mit 0.6 M NaCl eintritt (78), kann anscheinend auch bei der H1-Extraktion nach der tRNA-Methode nicht ganz vermieden werden. Wird Histon H1 zu dem H1-freien Chromatin zugegeben und dann erst mit Micrococcus-Nuklease abgebaut, kann kein Unterschied zu den Abbaumustern von unbehandeltem Chromatin oder Zellkernen festgestellt werden (Abb. 22A, zum Vergleich Abb. 11).

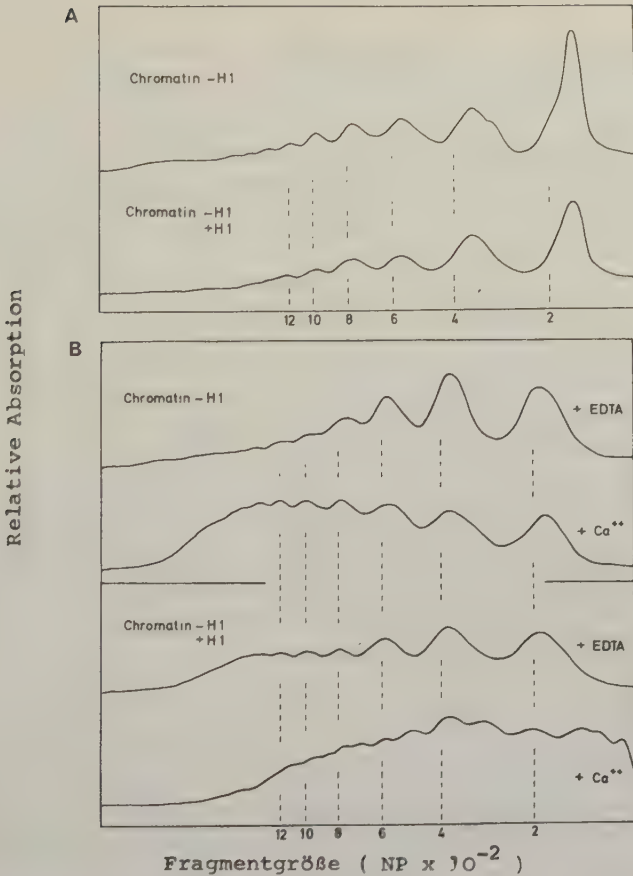


Abb. 22: Effekt des Histons H1 auf die Abbaumuster von Chromatin mit *Micrococcus*-Nuklease bzw. DNAase II

A. Das nach der tRNA-Methode H1-frei gemachte Chromatin wurde mit *Micrococcus*-Nuklease (5 Einheiten/ml) 3 min. bei 37°C inkubiert, oder zuerst Kalbsthymus Histon H1 (1 H1 pro 200 Nukleotidpaare DNA) zu dem H1-freien Chromatin zugegeben und dann mit dieser Nuklease für 6 min. abgebaut.

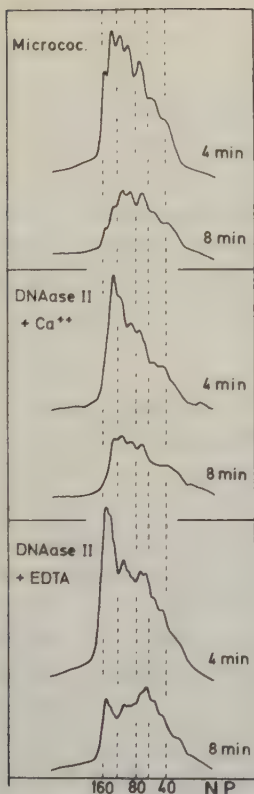
B. Das H1-freie bzw. mit Histon H1 "rekonstituierte" Chromatin wurde mit DNAase II (100 Einheiten/ml) in Gegenwart von 1 mM EDTA pH 7.0 5 min. bei 37°C inkubiert. In Gegenwart von 1 mM CaCl₂ anstelle von 1 mM EDTA wurde das H1-freie 5 min. und das mit H1 "rekonstituierte" Chromatin 10 min. bei 37°C mit DNAase II (250 Einheiten/ml) abgebaut. In den Abbildungen sind die Densitogramme der Abbauprodukte zu sehen. Die eingezeichneten Größen von 200, 400 usw. Nukleotidpaaren wurden durch Coelektrophorese mit den Eco RII-Fragmenten der Mäuse Satelliten-DNA bestimmt (35).

Wird mit DNAase II in Gegenwart von EDTA inkubiert, unter Bedingungen also, unter denen die DNAase II fast ausschließlich im internukleosomalen Bereich im Abstand von ungefähr 200 Nukleotidpaaren spaltet, kann ein Einfluß von Histon H1 auf die Abbaumuster nicht beobachtet werden (Abb. 22B). Sowohl im H1-freien wie im mit H1 "rekonstituierten" Chromatin beträgt die Periodizität ungefähr 200 Nukleotidpaare. Ein deutlicher Effekt von Histon H1 wird aber in den Abbaumustern von DNAase II sichtbar, wenn in Gegenwart von CaCl_2 inkubiert worden war. Zwar ist der Untergrund in den Abbaumustern von H1-freiem Chromatin unter diesen Inkubationsbedingungen leicht erhöht, aber es tritt in ihnen eine deutliche 200-Nukleotidpaar-Periodizität ohne Andeutung von Zwischenbanden auf. War hingegen dem H1-freien Chromatin Histon H1 zugesetzt und dann erst mit DNAase II abgebaut worden, erscheint einem höheren Untergrund überlagert eine 100-Nukleotidpaar-Periodizität (Abb. 22B). Wie diese Versuche zeigen, ist der Übergang vom 200- zum 100-Nukleotidpaar-Abbaumuster bei der Behandlung von Chromatin mit DNAase II vom gleichzeitigen Vorhandensein des Histons H1 und der divalenten Kationen abhängig.

Im Anschluß an diese Ergebnisse soll der Einfluß der Ionenbedingungen auf die DNAase II-Abbaumuster von Nukleosomenkernen kurz erwähnt werden. Nukleosomenkerne wurden durch Saccharosegradientenzentrifugation isoliert, mit Micrococcus-Nuklease bzw. DNAase II abgebaut und die subnukleosomalen DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese analysiert. Wie die Abbildung 23 zeigt, unterscheiden sich die DNAase II-Abbauprodukte je nach den Ionenbedingungen, unter denen mit der Nuklease inkubiert worden war. Der Befund könnte durch die Annahme gedeutet werden, daß die divalenten Kationen nicht nur die Kondensation des Chromatins über das Histon H1 bewirken, sondern daß sie auch die DNA-Histon-Wechselwirkung in der Chromatinuntereinheit beeinflussen. Da die meisten anderen Nukleasen nur in Gegenwart von divalenten Kationen die DNA abbauen können, stellt die DNAase II möglicherweise auch ein wichtiges Hilfsmittel zur Analyse der Nukleosomenkern-Struktur dar.

Abb.23: Abbau von Nukleosomenkernen mit *Micrococcus*-Nuklease bzw. DNAase II

Relative Absorption



liert und je 5 μ g in einem 3,5 % Agarose-Plattengel elektrophoreseiert. Als Molekulargewichtsmarker dienten die Bsu-Fragmente der PM2-DNA (63). In der Abbildung sind die Densitogramme zu sehen.

3.3.2 Zugabe von H1-Fragmenten zu H1-freiem Chromatin und Abbau mit *Micrococcus*-Nuklease bzw. DNAase II

Ziel der Versuche, H1-Fragmente zu H1-freiem Chromatin zuzugeben, war es, Auskunft darüber zu erhalten, ob Teile des Histons H1 für sich in der Lage sind, die DNAase II-Abbaumuster in der Weise zu beeinflussen, wie es für intaktes Histon H1 gezeigt werden konnte. Mit Hilfe von Proteasen ist es möglich, das Histon H1 an bestimmten Stellen zu spalten. So spaltet α -Chymotrypsin das Kalbsthymus Histon H1 in die Fragmente 1-106 und 107-212 (81). Mit Thrombin erfolgt eine Spaltung zwischen Prolin und Lysin in den Positionen

121 und 122 (82). Das aminoterminaler Fragment 1-121 enthält außer dem kurzen, basischen Ende 1-40 (60) die ganze apolare Region des Histons H1, während das carboxyterminale Fragment 107-212 fast ausschließlich aus dem langen, basischen Ende 116-212 des Histons H1 besteht (82). Diese beiden Fragmente, freundlicherweise von E.M. Bradbury zur Verfügung gestellt, wurden im folgenden Versuch zu dem H1-freien Chromatin zugegeben (1 H1-Fragment pro 200 Nukleotidpaare) und ihr Einfluß auf die DNAase II-Abbaumuster untersucht.

Das mit den H1-Fragmenten "rekonstituierte" H1-freie Chromatin zeigte keine unerwarteten Effekte in den Abbaumustern durch Micrococcus-Nuklease. Die Densitogramme entsprachen in beiden Fällen ungefähr dem in Abbildung 22A für das H1-freie Chromatin gezeigten. Deutliche Einflüsse hatte die Zugabe von H1-Fragmenten auf die DNAase II-Abbaumuster. So zeigt das mit dem aminoterminalen H1-Fragment "rekonstituierte" H1-freie Chromatin eine 200 Nukleotidpaar-Periodizität, wenn in Gegenwart von EDTA mit DNAase II inkubiert wurde. War CaCl_2 bei der Inkubation zugegen, sind der 200-Nukleotidpaar-Periodizität zusätzliche Banden überlagert, die in der Gelelektrophorese aber langsamer wandern als die sonst gefundenen 300, 500 bzw. 700 Nukleotidpaar-Banden (Abb. 24). Die DNAase II-Abbaumuster des mit dem carboxyterminalen H1-Fragment "rekonstituierten" H1-freien Chromatins sind insofern überraschend, als unabhängig von den Ionenbedingungen bei der Inkubation über einem höheren Untergrund Banden mit einer Periodizität von ungefähr 100-Nukleotidpaaren auftreten und ein Abbau in das 200-Nukleotidpaar-Muster nicht mehr beobachtet wurde (Abb. 24). Beeinträchtigt werden diese Ergebnisse durch die Tatsache, daß eine exakte Quantifizierung der zugegebenen Mengen von H1-Fragmenten sowohl durch Absorptionsmessung (A_{230} bzw. A_{275}), wie auch im SDS-Gel schwierig war und ein Fehler von einem Faktor 2 daher nicht ausgeschlossen werden kann.

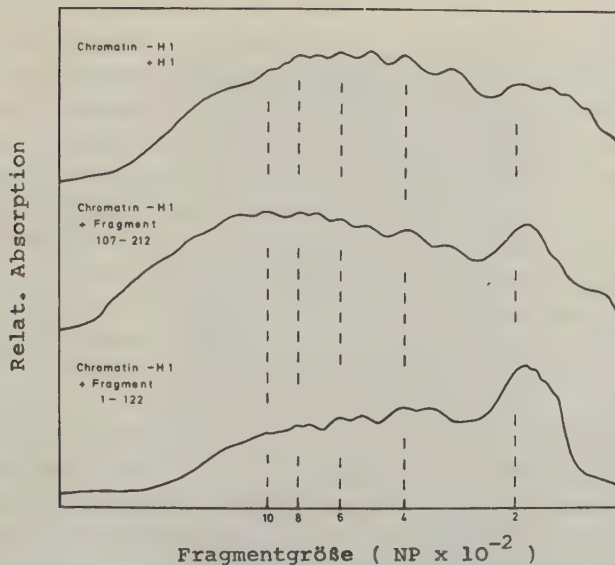


Abb. 24: Effekt von H1-Fragmenten auf den Abbau von Chromatin mit DNAase II

Zu dem nach der tRNA-Methode H1-frei gemachten Chromatin wurde einerseits das aminoternale Fragment (1-122), andererseits das carboxyterminale Fragment (107-212) von Histon H1 zugegeben (1 H1-Fragment pro 200 Nukleotidpaare DNA) und mit DNAase II (250 Einheiten/ml) in Gegenwart von 1 mM CaCl₂ 6 min. bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde isoliert, je 5 µg in einem 1.8% Agarose-Plattengel elektrophoresiert und danach densitometriert. Als Vergleichsprobe ist das Abbaumuster von H1-freiem Chromatin gezeigt, das mit ganzem Histon H1 "rekonstituiert" und dann wie unter Abbildung 22B beschrieben mit DNAase II in Gegenwart von 1 mM CaCl₂ abgebaut worden war. Die gestrichelt eingezeichneten Linien bei 200, 400 usw. Nukleotidpaaren beruhen auf Coelektrophorese mit den Eco RII-Fragmenten der Mäuse Satelliten-DNA (35).

3.4 Analyse der Einzelstrangfragmente aus dem DNAase II-Abbau von Mäuseleberkernen

Die DNAase II erzeugt beim Abbau der DNA mit großer Häufigkeit sowohl Doppelstrang- wie Einzelstrangbrüche (53), während die Micrococcus-Nuklease ausschließlich Doppelstrang- (83) und die DNAase I bevorzugt Einzelstrangbrüche einführt (52). Werden die denaturierten DNA-Fragmente aus dem Chromatinabbau mit DNAase I durch Gelelektrophorese analysiert, so zeigt sich ein Bandenmuster

mit einer Periodizität von 10 Nukleotiden (28). Um die DNAase II-Abbauprodukte auf Einzelstrangbrüche hin zu untersuchen, wurden Mäuseleberkerne mit DNAase II inkubiert, die DNA-Fragmente isoliert, denaturiert und durch Gelelektrophorese analysiert. Wie Abbildung 25 zeigt, bilden die Abbauprodukte eine Serie von intensiven Banden. Die Molekulargewichte der Fragmente entsprechen denen aus dem DNAase I-Abbau von Chromatin, wie durch Vergleich ermittelt wurde. Im Unterschied zu den DNAase I-Mustern, für die eine besonders intensive Bande bei 80 Nukleotiden charakteristisch ist (28), entspricht die intensivste Bande in den DNAase II-Abbaumustern einem Fragment von 90 Nukleotiden.

Zusätzlich zu den Banden im Abstand von 10 Nukleotiden - es konnten mindestens 18 solcher Banden gezählt werden - sind DNA-Fragmente von 200, 300, 400, 500, 600 und 800 Nukleotiden zu sehen. Die Banden, die den Fragmenten von 300 und 500 Nukleotiden dieser Serie entsprechen, sind deutlich weniger intensiv als die andern, sie umgebenden von 200, 400 bzw. 600 Nukleotiden (Abb. 25d). Wie in Abbildung 12 gezeigt wurde, ist ein solcher Intensitätsunterschied in den doppelsträngigen DNA-Fragmenten beim Abbau von Mäuseleberkernen mit DNAase II nicht zu beobachten. Das könnte darauf hindeuten, daß in den DNA-Fragmenten, zu deren Entstehung eine intranukleosomale Spaltung erforderlich ist, häufiger Einzelstrangbrüche enthalten sind als in den Abbauprodukten, die durch zwei internukleosomale Brüche entstehen. Werden einzelne Nukleosomenfraktionen der DNAase II-Abbauprodukte über Saccharosegradienten isoliert (Abb. 13A), deren DNA-Fragmente denaturiert und durch Gelelektrophorese analysiert, so findet man fast ausschließlich Bandenmuster mit der 10-Nukleotid-Periodizität (Abb. 24a-c). Das läßt darauf schließen, daß der größte Teil der DNA aus den hier isolierten oligomeren Nukleosomen Einzelstrangbrüche in regelmäßigen Abständen enthalten muß.

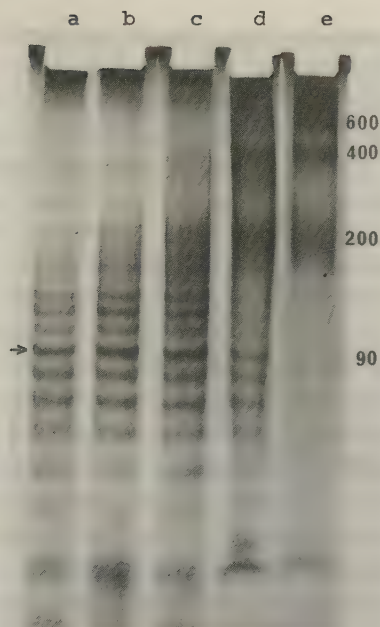


Abb. 25: Einzelstrangfragmente beim Abbau von Chromatin mit DNAase II

Mäuseleberkerne wurden mit DNAase II (120 Einheiten/ml) 60 min. bei 37°C inkubiert und die Abbauprodukte in einem Saccharosegradienten wie unter Abbildung 13 beschrieben zentrifugiert. Die Gradientenfractionen der dimeren (a), trimeren (b) und tetrameren (c) Nukleosomen wurden isoliert, die DNA extrahiert, in 10 M Harnstoff bei 80°C für 5 min. inkubiert und in einem 6% Polyacrylamid-Harnstoff-Plattengel (85) bei 20 mA für 8 Std. elektro-phoresiert. Ein Teil der DNAase II-Abbauprodukte von Mäuseleberkernen wurde unfraktioniert in gleicher Weise analysiert (d). In e sind die denaturierten Fragmente aus dem Abbau von Mäuseleberkernen mit Micrococcus-Nuklease (mit 10 Einheiten/ml für 60 min. inkubiert) zu sehen. Von allen Proben wurden 15 µg auf das Gel aufgetragen und nach der Elektrophorese mit dem Farbstoff "Stains-all" angefärbt (91). Der eingezeichnete Pfeil markiert das DNA-Fragment von 90 Nukleotiden, dessen Größe durch Vergleich mit den DNAase I-Fragmenten aus Mäuseleberkernen ermittelt wurde.

3.5 Diskussion: Ergebnisse aus dem Chromatinabbau mit DNAase II

Verglichen mit dem Chromatinabbau durch andere Nukleasen liegt der wesentliche Unterschied beim Abbau mit DNAase II in der zusätzlichen Spaltung des DNA-Doppelstrangs an einer Stelle im Nukleosom. Dieser Befund ist nicht auf den Abbau von Mäuseleberkernen beschränkt, sondern wurde durch den DNAase II-Abbau von Chromatin aus verschiedenen Organismen bestätigt (75,78,86). Der Unterschied ist möglicherweise in der Eigenschaft der DNAase II begründet, sowohl Einzelstrang- wie Doppelstrangbrüche in der DNA zu erzeugen (53). Es ist denkbar, daß ein Doppelstrangbruch im Nukleosom leichter erfolgt, nachdem mehrere Einzelstrangbrüche in die intranukleosomale DNA eingeführt worden sind, und daß die heterogenen Spaltprodukte, die zu dem Untergrund in den DNAase II-Abbaumustern führen, aus einer Vielzahl solcher ursprünglicher Einzelstrangbrüche resultieren. Diese Vermutungen werden durch Beobachtungen aus diesem Labor gestützt, daß beim Chromatinabbau mit DNAase I - einer Nuklease, die bevorzugt Einzelstrangbrüche erzeugt - über einem sehr hohen Untergrund Bandenmuster mit einer Periodizität von ungefähr 100 Nukleotidpaaren zu sehen sind.

Welche Struktureigenschaften des Nukleosoms den Doppelstrangbruch in der intranukleosomalen DNA ermöglichen, ist noch nicht bekannt. Der Befund, daß die eine Spaltstelle für die DNAase II mit der für die Micrococcus-Nuklease identisch ist, oder zumindest mit dieser überlappt, zeigt, daß die Spaltung in der intranukleosomalen DNA symmetrisch erfolgt. Nimmt man an, daß der Aufbau des Nukleosomenkerns aus je zwei der vier Histone H2A, H2B, H3 und H4 symmetrisch ist, wie es in mehreren Nukleosomen-Modellen angenommen wird (87-89), so liegt die intranukleosomale Spaltstelle für die DNAase II im Bereich einer zweizähligen Symmetrieachse des Nukleosoms.

Die Analysen des zeitlichen Verlaufs des Chromatinabbaus mit DNAase II machen deutlich, daß die 100-Nukleotidpaar-Periodizität nicht aus einem zunächst auftretenden 200-Nukleotidpaar-Raster hervorgeht, sondern daß die inter- und intranukleosomalen Spaltstellen ungefähr gleich schnell gespalten werden. Der Doppel-

strangbruch in der intranukleosomalen DNA führt zu keiner Änderung im Sedimentationsverhalten der Nukleosomen im Saccharosegradienten. Auch nach Behandlung mit 0.6 M NaCl konnte kein Anzeichen für eine neue Nukleosomen-Untereinheit von halber Größe gefunden werden.

Die Chromatinstruktur ändert sich sehr stark in Abhängigkeit von den Ionen-Bedingungen. So ist es möglich, Chromatin durch Entzug oder Zugabe von Ionen reversibel in einen dekondensierten oder kondensierten Zustand zu überführen. Es war interessant festzustellen, daß die Zugänglichkeit der intranukleosomalen Spaltstelle für die DNAase II stark von den Inkubationsbedingungen beeinflusst wird und die 100- bzw. 200-Nukleotidpaar-Periodizität unter Bedingungen auftritt, unter denen das Chromatin in kondensiertem bzw. dekondensiertem Zustand vorliegt.

Von Histon H1 ist bekannt, daß es an der durch Ionen induzierten Kondensation des Chromatins beteiligt ist und eine Kondensation nicht mehr erfolgt, wenn H1 aus dem Chromatin entfernt wurde (31). Wie die Versuche eindeutig zeigen, kann der Ionen-Effekt auf die Abbaumuster nicht mehr beobachtet werden, wenn H1-frei gemachtes Chromatin mit DNAase II inkubiert wird. Die intranukleosomale Spaltstelle ist erst nach Zugabe von Histon H1 zu dem H1-freien Chromatin wieder zugänglich, d.h. der reversible Übergang von der 200- zur 100-Nukleotidpaar-Periodizität beim Abbau von Chromatin mit DNAase II erfordert das gleichzeitige Vorhandensein von Histon H1 und zweiwertigen bzw. hohe Konzentrationen von einwertigen Kationen.

Zusätzlich zu den Ionenbedingungen und dem Histon H1 scheint auch die Temperatur einen Einfluß auf die Spaltung der intranukleosomalen DNA durch die DNAase II zu haben. So wurde gefunden, daß beim Abbau von Rattenleberkernen bei 0°C fast ausschließlich eine 200-Nukleotidpaar-Periodizität auftritt (75). Ein solcher Temperatur-Effekt kann auch beim DNAase II-Abbau von Mäuseleberkernen beobachtet werden. Allerdings sind die Abbaumuster bei späteren Zeiten der 0°C-Inkubation ähnlich denen, wie sie für die 30°C-Inkubation von Rattenleberkernen gezeigt wurden (75). Der Einfluß der Temperatur war nicht mehr zu beobachten, wenn die Inkubation mit DNAase II bei 0°C in Gegenwart von CaCl_2 durchgeführt wurde.

Eine interessante Parallele zum Abbau von Chromatin mit DNAase II zeigen die Ergebnisse, die mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen erhalten wurden (90). Die Autoren finden, daß unter Ionenbedingungen, unter denen hier ein Übergang von der 200- zur 100-Nukleotidpaar-Periodizität in den DNAase II-Abbaumustern festgestellt wird, das Chromatin in superhelikalen Strukturen kondensiert, die sie Solenoide nennen. Dieser Befund läßt hoffen, daß durch den Abbau von Chromatin mit DNAase II nicht nur Informationen über die Nukleosomenkette, sondern möglicherweise auch über die Anordnung dieser Kette in Strukturen höherer Ordnung gewonnen werden können.

4.0 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit enthält Beiträge zur Analyse hochrepetitiver DNA-Komponenten und zu Fragen der Chromatinstruktur. Als Analysemethode diente die Spaltung der DNA mit Hilfe von Nukleasen.

Die Meerschweinchen-DNA enthält, wie schon länger bekannt, drei Satelliten-DNA-Komponenten. Die vergleichende Analyse mit verschiedenen Restriktionsnukleasen macht deutlich, daß sich die drei DNA-Komponenten in ihrer Struktur sehr stark unterscheiden. Die Satelliten III-DNA wird durch die Restriktionsnuklease Bsu vollständig in eine Fragmentserie gespalten. Die Analyse der Muster ergibt, daß dieser Satellit aus ungefähr 215 Nukleotidpaare langen repetitiven Einheiten aufgebaut ist, von denen jede zwei Spaltstellen für Bsu besitzt. Beim Abbau der Satelliten III-DNA durch vier andere Nukleasen entstehen Fragmentserien gleicher Periodizität. Dabei stellt sich allerdings heraus, daß die Spaltstellen eine andere Verteilung aufweisen und daß sie für jede dieser Nukleasen auf verschiedenen Abschnitten der Satelliten-DNA gehäuft vorkommen müssen.

Die Satelliten II-DNA ist fast vollständig resistent gegenüber den verwendeten Restriktionsnukleasen, während die Satelliten I-DNA durch mehrere dieser Nukleasen sehr weit gespalten wird, die Abbauprodukte aber ausgesprochen heterogen sind und keine offensichtliche Regelmäßigkeit aufweisen. Danach würde man die Satelliten II-DNA als sehr sequenzeinheitlich bezeichnen, während die Satelliten I-DNA stark divergiert sein muß. Neben dem Nachweis der Homogenität bzw. Heterogenität ließen die Spaltmuster der Satelliten III-DNA neue Schlüsse auf die Struktur und mögliche Entstehung dieser DNA-Komponente zu.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen zur Chromatinstruktur stand der Abbau mit Hilfe von DNAase II. Diese Nuklease spaltet freie DNA ohne Sequenzspezifität und hat eine für diese Arbeit wichtige Eigenschaft, sie benötigt im Gegensatz zu den meisten anderen für den Abbau von Chromatin eingesetzten Nukleasen keine divalenten Kationen. Diese wiederum, so weiß man seit längerem, bewirken eine starke Kondensation des Chromatins.

Die Inkubation von intakten Mäuseleberkernen zeigte, daß die DNAase II die doppelsträngige DNA nicht nur in der internukleosomalen Region des Chromatins spalten kann, sondern zusätzlich an einer Stelle innerhalb des Nukleosoms, so daß Abbbaumuster mit einer Periodizität von ungefähr 100 Nukleotidpaaren entstehen. Bei Annahme eines symmetrischen Aufbaus des Nukleosoms liegt die intranukleosomale Spaltstelle im Bereich einer zweizähligen Symmetrieachse. Durch Analyse der Deoxyribonukleoprotein-Partikel nach DNAase II-Abbau konnte gezeigt werden, daß dabei nicht eine neue Chromatinuntereinheit halber Größe entsteht. Offensichtlich werden die Nukleosomen trotz des internen Bruchs der DNA durch Protein-Protein- und Protein-DNA-Wechselwirkungen zusammengehalten.

Aus den Zellkernen läßt sich durch Behandlung mit EDTA eine entfaltete Form des Chromatins erhalten. Es wurde nachgewiesen, daß dieses Chromatin durch DNAase II nur noch an den internukleosomalen Stellen gespalten wird. Erst nachdem durch Zusatz von divalenten Kationen eine Kondensation des Chromatins bewirkt wurde, entstehen bei der Spaltung mit DNAase II wieder Abbbaumuster, die eine 100-Nukleotidpaar-Periodizität aufweisen.

Von Histon H1 war schon länger bekannt, daß es an der durch Salz induzierten Kondensation des Chromatins maßgeblich beteiligt ist. Deshalb lag es nahe, den Einfluß dieses Histons auf den Abbau von Chromatin mit DNAase II zu untersuchen. Durch schonende Entfernung von Histon H1 und Behandlung des H1-freien Chromatins mit DNAase II konnte nachgewiesen werden, daß unabhängig von den Ionenbedingungen die DNA fast ausschließlich in der internukleosomalen Region des Chromatins gespalten wurde. Erst nach Zugabe von Histon H1 zu dem H1-freien Chromatin war der Effekt der Ionenbedingungen auf die DNAase II-Abbaumuster wieder zu beobachten. Das zeigt, daß die Spaltung des DNA-Doppelstranges im Nukleosom nur in Gegenwart von Histon H1 und ein- bzw. zweiwertigen Kationen erfolgen kann.

Die Deutung dieser Versuche geht in zwei Richtungen. Zum einen ist die Existenz dieser für die DNAase II zugänglichen Stelle im

Nukleosom wichtig im Zusammenhang mit der Feinstruktur der Chromatinuntereinheit. Zum anderen korreliert die Zugänglichkeit der intranukleosomalen Stelle für diese Nuklease mit dem unterschiedlichen Kondensationsgrad des Chromatins, so daß der Abbau mit DNAase II möglicherweise eine Analyse von Chromatinstrukturen höherer Ordnung durch biochemische Methoden gestattet.

5.0 Materialien und Methoden

5.1 DNA-Isolierung aus Meerschweinchenleber

Die Aufarbeitung erfolgte nach der von Flamm et al. (6) beschriebenen Methode, die durch eine Hydroxyapatit-Chromatographie erweitert wurde.

Alle Schritte bis zur SDS-Zugabe wurden bei 0°C durchgeführt. 50 g frische Leber wurden mit kalter 0.15 M NaCl-Lösung perfundiert, durch ein Maschendraht-Sieb gedrückt, das den größten Teil des Bindegewebes zurückhielt, und in 100 ml Extraktionspuffer (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA pH 8.0) homogenisiert (Potter-Elvehjem). Das Homogenat wurde in der Sorvall-Zentrifuge mit dem Rotor SS34 30 min. bei 11 000 Upm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zentrifugat in 150 ml Extraktionspuffer homogenisiert. Das Homogenat wurde 1.5% an SDS und 1 M an NaClO₄ gemacht und 30 min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurden 2 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (5:1 V/V) dazugegeben, 15 min. bei 40°C im Wasserbad geschüttelt, in der Zentrifuge 15 min. bei 5000 Upm zentrifugiert, die wässrige Phase abgenommen und die Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol zweimal wiederholt. Die wässrige Phase aus der letzten Zentrifugation wurde mit 2 Vol. 95% Äthanol überschichtet, mit einem Spatel unter langsamem Rühren die ausfallende DNA aufgewickelt und der Alkoholniederschlag in 100 ml 10 mM Tris-HCl pH 8.3 unter leichtem Rühren bei 0°C über Nacht gelöst.

Die Herstellung des Hydroxyapatits erfolgte nach Bernardi (33). Die Puffer für die Hydroxyapatit(HAP)-Säulenchromatographie waren:

Puffer A: 3 M KCl, 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.8

Puffer B: 3 M KCl, 0.5 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.8

Puffer C: 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.8

Die in 100 ml 10 mM Tris-HCl pH 8.3 gelöste DNA wurde mit Puffer A auf 2-3 A₂₆₀-Einheiten pro ml verdünnt, bei Raumtemperatur auf eine HAP-Säule (3x15 cm) aufgetragen, die Säule mit

600 ml Puffer A gewaschen und ein linearer Gradient von Puffer A nach Puffer B (je 600 ml) angelegt. Die DNA wird zwischen 0.22 und 0.25 M Phosphat von der Säule eluiert, während Proteine gar nicht adsorbiert werden und die RNA bei ungefähr 0.15 M Phosphat heruntergewaschen wird (33). Die HAP-Säule wurde danach mit 500 ml Puffer C gewaschen, mit 500 ml Puffer A äquilibriert und konnte so mehrmals verwendet werden.

5.2 $\text{Ag}^+/\text{Cs}_2\text{SO}_4$ -Dichtegradienten-Zentrifugation

Die DNA enthaltenden Fraktionen von der HAP-Säule (ungefähr 600 A_{260} -Einheiten aus 50 g Leber) wurden extensiv gegen 1 mM Natriumtetraborat pH 9.2 dialysiert und am Rotationsverdampfer um den Faktor 5-10 eingeeengt. Die Lösung wurde für die Zentrifugation mit AgNO_3 (Titrisol von Merck) auf ein Verhältnis Ag^+/DNA -Phosphat von 0.27 eingestellt, 5 mM an Natriumtetraborat gemacht und mit Cs_2SO_4 (Suprapur von Merck) auf eine Enddichte von 1.5 g/cm^3 gebracht (8). Zentrifugiert wurde in der Beckman Ultrazentrifuge für 60 Std. bei 20°C mit $90\,000 \times g$ für analytische Zwecke im Ti 50-Rotor, für präparative Zwecke im 35er-Rotor und für Rezentrifugationen der Fraktionen von Satelliten II-, bzw. Satelliten III-DNA im Ti 60-Rotor. Die Gradienten wurden durch Nadeln mit Hilfe einer Technicon-Pumpe von unten nach oben ausgepumpt, die Satelliten-DNA-Fraktionen gegen 5 M NaCl, dann gegen 1/100 SSC extensiv dialysiert, um einen Faktor 10 einrotiert, mit etwas Chloroform versetzt und bei 4°C aufbewahrt.

5.3 Restriktionsnukleasen

Die Restriktionsnukleasen wurden freundlicherweise von W. Hörz, R.E. Streeck und W. Zolg aus dieser Abteilung zur Verfügung gestellt. Hinsichtlich der Enzymaufarbeitung und Enzymreinigung sowie der Inkubationspuffer sei auf Referenz 35 verwiesen.

5.4 Gelelektrophorese

Die Agarosegele wurden mit Sea Kem Agarose (Marine Colloids Inc.) im Tris-Boratpuffer (93), der 1 $\mu\text{g/ml}$ Äthidiumbromid enthielt, teils in Plexiglasröhrchen von 7 mm Durchmesser und 12 bzw. 20 cm Länge, teils als Plattengele (14 x 24 x 0,25 cm) hergestellt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 60-80 V für ungefähr 4 Std. Die Gele wurden dann unter UV-Licht photographiert und die Negative wie in Referenz 93 beschrieben ausgewertet. Für Molekulargewichtsbestimmungen wurde das Äthidiumbromid im Gel und Elektrophoresepuffer weggelassen und die Gele erst nach der Elektrophorese mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Äthidiumbromid 30 min. angefärbt.

Für die 8 % Acrylamid-Rundgele wurde Acrylamid mit 0.2 % Bisacrylamid vernetzt, in Gegenwart von 0.1 % TEMED mit 0.1 % APS im Tris-Boratpuffer (93) polymerisiert, bei 60 V für 4 Std. elektro-phoresiert und danach 30 min. in Äthidiumbromid (1 $\mu\text{g/ml}$ H_2O) angefärbt.

Alle DNA-Proben wurden vor der Elektrophorese mit 2 Vol. 95 % Äthanol gefällt und in 10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM EDTA pH 7.0 und 20 % Saccharose auf die Gele aufgetragen.

5.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Gelbereiche, die die DNA-Fragmente enthielten, wurden mit einer Rasierklinge ausgeschnitten, die Gelstücke in 15 Vol. 0.1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6.8, 3 M KCl homogenisiert (Potter-Elvehjem), das Homogenat im Sorvall SS34-Rotor für 20 min. bei 17 000 Upm zentrifugiert, der Überstand zweimal mit 1 Vol. Isoamylalkohol und danach mit 1 Vol. Äther extrahiert. Nach der Entfernung des Äthers wurde die Lösung auf eine HAP-Säule von 0.5 ml Volumen aufgetragen, die Säule mit 5 ml Puffer A (Kap. 5.1) gewaschen und die DNA danach mit 2 ml Puffer B eluiert. Die DNA wurde gegen 1/100 SSC dialysiert, die Lösung um den Faktor 10 einrotiert und so für die Nachspaltung eingesetzt. Die Endausbeute an isolierten DNA-Fragmenten betrug 50-60 % des theoretisch errechneten Wertes.

5.6 Zellkernisolierung aus Mäuseleber, EDTA-Behandlung und Herstellung von löslichem Chromatin mit Nuklease

Die Isolierung von Zellkernen aus Mäuseleber erfolgte wie in Referenz 74 beschrieben. In einigen Aufarbeitungen war zusätzlich 1 mM PMSF und 0.2% Triton X-100 zum Homogenisieren in der 0.34 M Saccharose zugegeben worden. Die Kerne wurden dann bei 25 000 Upm im SW27-Rotor (Beckman) für 2 Std. durch ein Kissen von 12 ml 2.1 M Saccharose zentrifugiert, einmal in Puffer A (74) gewaschen und direkt weiter verarbeitet, oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Die EDTA-Behandlung der Zellkerne, als eine Methode zur Herstellung von Chromatin, wurde nach Referenz 58 durchgeführt, das erhaltene Chromatingel zweimal mit 10 mM Tris-HCl pH 7.0 gewaschen und für die Inkubation wieder in diesem Puffer aufgenommen.

Die Herstellung von löslichem Chromatin mit Hilfe von Nukleasen ist in Referenz 94 beschrieben worden. 50 A_{260} -Einheiten pro ml (bezogen auf die DNA) der mit Triton X-100 behandelten Mäuseleberkerne wurden für die H1-Extraktion in 10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM PMSF mit Micrococcus-Nuklease (15 Einheiten/ml) 7 min. bzw. für die Saccharosegradienten-Zentrifugation mit Micrococcus-Nuklease oder DNAase II unter den dort angegebenen Bedingungen bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit EDTA gestoppt (Endkonzentration 2 mM). Die Inkubationsmischung wurde bei 0°C für 5 min. bei 4000 x g zentrifugiert, die flüssige Phase vorsichtig entfernt, der Rückstand in 0.2 mM EDTA pH 7.0 aufgenommen, durch Aufsaugen in eine Pasteurpipette homogenisiert, der unlösliche Anteil wieder bei 4000 x g für 5 min. zentrifugiert und der 0.2 mM EDTA-Überstand, das sog. lösliche Chromatin, abgenommen und direkt weiter verarbeitet oder bei -20°C eingefroren.

5.7 H1-Entfernung aus dem Chromatin mit tRNA

Das nach der Nuklease-Methode löslich gemachte Chromatin (siehe oben) wurde in 1 mM $MgCl_2$, 5 mM Tris-HCl pH 8.0 (79) mit einem

5fachen Überschuß (bezogen auf A_{260} -Einheiten) an Hefe-tRNA gemischt, 1 Std. bei 0°C inkubiert und danach auf einen Saccharosegradienten (wie in Abbildung 20 beschrieben) aufgetragen. Die tRNA war zuvor mit Phenol extrahiert, mit Alkohol gefällt, gegen 5 mM Tris-HCl pH 8.0 dialysiert und mit 1/100 Vol. einer 100 mM $MgCl_2$ -Lösung versetzt worden. Die Absorption bei 260 nm betrug ungefähr 400 für die tRNA-Lösung und ungefähr 40 für die Chromatin-Lösung. Es konnte kein Unterschied in der H1-Extraktion festgestellt werden, ob unfractionierte tRNA aus Hefe (Boehringer) oder eine von tRNA^{Phe} und tRNA^{Ser} befreite Fraktion einer BD-Zellulose-Chromatographie (95) eingesetzt wurde.

5.8 Zugabe von Histon H1 bzw. H1-Fragmenten zu H1-freiem Chromatin

Die Fraktion II des H1-freien Chromatins aus dem in Abbildung 20 beschriebenen Saccharosegradienten wurde in der Kälte gegen 1 mM Tris-HCl pH 7.0 dialysiert. Die Absorption der Chromatinlösung nach der Dialyse betrug 1 A_{260} -Einheit/ml. Zu 1 ml dieser Lösung wurden 8 µg Histon H1, oder 4.5 µg des N-terminalen H1-Fragments, oder 4.0 µg des C-terminalen H1-Fragments in 300 µl 1 mM Tris-HCl pH 7.0 unter leichtem Schütteln zugegeben. Die Lösung wurde 1 Std. auf Eis gestellt und danach für die Spaltung mit 1/10 Vol. 100 mM Tris-HCl pH 7.0 gemischt.

Das Kalbsthymus Histon H1 wurde von M. Steinmetz (78), die Kalbsthymus H1-Fragmente von E.M. Bradbury (81,82) zur Verfügung gestellt.

6.0 Literaturverzeichnis

1. P.M.B. Walker, Progr. Biophys. Mol. Biol. 23, 145-190 (1971)
2. E.M. Southern, Eukaryotic DNA, in: MTP International Review of Science, Biochemistry Series One, Vol. 6, 101-139 (Hrsg. K. Burton) London (1974)
3. R.J. Britten, D.E. Kohne, Science 161, 529-540 (1968)
4. J.G. Wetmur, N. Davidson, J.Mol.Biol. 31, 349-370 (1968)
5. M. Meselson, F.W. Stahl, J. Vinograd, Proc.Natn. Acad.Sci. U.S.A. 43, 581 (1957)
6. W.G. Flamm, H.E. Bond, H.E. Burr, Biochim. Biophys.Acta 129, 310-317 (1966)
7. S. Kit, J.Mol.Biol. 3, 711-716 (1961)
8. G. Corneo, E. Ginelli, C. Soave, G. Bernardi, Biochemistry 7, 4373-4379 (1968)
9. G. Corneo, E. Ginelli, E. Polli, Biochemistry 9, 1565-1571 (1970)
10. Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man, Symposia Medica Hoechst 6 (1973)
11. D.M. Skinner, W.G. Beattie, F.R. Blattner, B.P. Stark, J.E. Dahlberg ; Biochemistry 13, 3930-3937 (1974)
12. J.G. Gall, D.D. Atherton, J.Mol.Biol. 84, 633-664 (1974)
13. S.A. Endow, M.L. Polan, J.G. Gall, J.Mol.Biol. 96, 655-692, (1975)
14. W. Salser, S. Bowen, D. Browne, F.E. Adli, N. Fedoroff, K. Fry, H. Heindell, G.Paddock, R. Poon, B. Wallace, P. Whitcome, Fed.Proc. 35, 23-35 (1976)
15. E.M. Southern, Nature (Lond.) 227, 794-798 (1970)
16. P.A. Biro, A.C. Carr-Brown, E.M. Southern, P.M.B.Walker, J.Mol.Biol. 94, 71-86 (1975)
17. R.J. Britten, J. Smith, Carnegie Inst.Wash. Year Book 68, 378-386 (1970)
18. P.M.B. Walker, Nature 229, 306-308 (1971)
19. G.P. Smith, Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol. 38, 507-513 (1973)
20. G.P. Smith, Science 191, 528-535 (1976)

21. Histones and Nucleohistones, Plenum Press, London + New York (1971) (Hrsg. D.M.P. Phillips)
22. The Structure and Function of Chromatin, Ciba Foundation Symposium 28 (1975)
23. J.F. Pardon, M.F.H. Wilkins, J.Mol.Biol. 68, 115-124 (1972)
24. B. Lewin, Nature 254, 651-653 (1975)
25. G. Felsenfeld, Nature 257, 177-178 (1975)
26. T. Barrett, Nature 260, 576-578 (1976)
27. M. Noll, R.D. Kornberg, J.Mol.Biol. 109, 393-404 (1977)
28. M. Noll, Nucl. Acids Res. 1, 1573-1578 (1974)
29. F.H.C. Crick, A. Klug, Nature (Lond.) 255, 530-533 (1975)
30. H.M. Sobell, C. Tsai, S.G. Gilbert, S.C. Jain, T.D. Sakore, Proc.Natn. Acad.Sci. U.S.A. 73, 3068-3072 (1976)
31. E.M. Bradbury, B.G. Carpenter, H.W.E.Rattle, Nature 241, 123-126 (1973)
32. J. Faulhaber, G. Bernardi, Biochim. Biophys. Acta 140, 561-564 (1967)
33. G. Bernardi, Procedures in Nucleic Acid Research (Hrsg.: G.L. Cantoni, R.D. Davies), Vol. 2, 455-499, Harper+Row, New York (1971)
34. W.G. Flamm, P.M.B. Walker, M. McCallum, J.Mol.Biol. 42, 441-455 (1969)
35. W. Hörz, H.G. Zachau, Eur.J.Biochem. 73, 383-392 (1977)
36. E.M. Southern, J.Mol.Biol. 94, 51-69 (1975)
37. C.L. Schildkraut, J. Marmur, P. Doty, J.Mol.Biol. 4, 430-443 (1962)
38. W. Hörz, H.G. Zachau, FEBS-Symp. Budapest 33, 403-408 (1975)
39. S. Manteuil, D.H. Hamer, C.A. Thomas, Cell 5, 413-422 (1975)
40. C.I. Shen, G. Wieseahn, I.E. Hearst, Nucl. Acids. Res. 3, 931-951 (1976)
41. F. Fittler, Eur.J.Biochem. 74, 343-352 (1977)
42. E.M. Southern, Repetitive DNA in Mammals aus: Modern Aspects in Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man, Symposia Medica Hoechst 6, 19-27, Stuttgart (1973)
43. K. Harbers, B. Harbers, J.H. Spencer, Fed.Proc. 35, 1677a (1976)

44. D.K. Oosterhof, J.C. Hozier, R.L. Rill, Proc.Natn. Acad. Sci. U.S.A. 72, 633-637 (1975)
45. C.L.F. Woodcock, H.E. Sweetman, L.-L. Frado, Exp.Cell Res. 97, 111-119 (1976)
46. C. Spadafora, G. Geraci, Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 291-295 (1976)
47. B. Sollner-Webb, R.D. Camerini-Otero, G. Felsenfeld, Cell 9, 179-193 (1976)
48. M. Yaneva, G. Dessev, Mol.Biol.Rep. 3, 227-234 (1977)
49. P. Lesca, J.Biol. Chem. 251, 116-123 (1976)
50. F.A. Cotton, E.E. Hazen Jr., D.C. Richardson, J.Biol. Chem. 241, 4389-4390 (1966)
51. H. Taniuchi, C.B. Anfinsen, J. Biol. Chem. 241, 4366-4385 (1966)
52. M. Laskowski Sr., The Enzyme 3rd Ed. IV, 289-311 (Hrsg.: P.D. Boyer), Acad.Press New York (1971)
53. G. Bernardi, The Enzymes 3rd Ed. (Hrsg.: P.D. Boyer), Acad. Press, New York Vol. 4, 271-287 (1971)
54. H. Slor, T. Lev, J.Biol. Chem. 247, 2926-2930 (1972)
55. V.K. Laemmli, Nature 227, 680-685 (1970)
56. M. Noll, Nature 251, 249-251 (1974)
57. J.T. Finch, M. Noll, R.D. Kornberg, Proc.Natn.Acad.Sci. U.S.A. 72, 3320-3322 (1975)
58. C.W. Dingman, M.B. Sporn, J.Biol.Chem. 239, 3483-3492 (1964)
59. K.S. McCarty Jr., R.T. Vollmer, K.S. McCarty, Anal. Biochemistry 61, 165-183 (1974)
60. S.C. Rall, R.D. Cole, J.Biol. Chem. 246, 7175-7190 (1971)
61. E.M. Bradbury, S.E. Danby, H.W.E. Rattle, V. Giancotti, Eur.J.Biochem. 57, 97-105 (1975)
62. N.R. Morris, Cell 8, 357-363 (1976)
63. M. Noll, Cell 8, 349-355 (1976)
64. N.R. Morris, Cell 9, 627-632 (1976)
65. J.O. Thomas, V. Furber, FEBS Lett. 66, 274-280 (1976)
66. C. Spadafora, M. Bellard, J.L. Compton, P. Chambon, FEBS Lett. 69, 281-285 (1976)
67. B. Sollner-Webb, G. Felsenfeld, Biochemistry 14, 2915-2920 (1975)

68. A.J. Varshavsky, V.V. Bakayev, G.P. Georgiev, Nucl.Acids Res. 3, 477-492 (1976)
69. B.R. Shaw, T.M. Herman, R.T. Kovacic, G.S. Beaudrean, K.E. van Holde, Proc.Natn. Acad. Sci. U.S.A. 73, 505-509 (1976)
70. J.P. Whitlock Jr., R.T. Simpson, Biochemistry 15, 3307-3314 (1976)
71. S. Panyim, R. Chalkley, J.Biol. Chem. 246, 7557-7560 (1971)
72. A.L. Olins, D.E. Olins, Science (Wash.D.C.) 183, 330-332 (1974)
73. P. Oudet, M. Gross-Bellard, P. Chambon, Cell 4, 281-300 (1975)
74. D.R. Hewish, L.A. Burgoyne, Biochem. Biophys.Res. Commun. 52, 504-510 (1973)
75. W. Greil, T. Igo-Kemenes, H.G. Zachau, Nucl. Acids Res.3, 2633-2644 (1976)
76. E.M. Johnson, V.C. Littau, V.G. Allfrey, E.M. Bradbury, H.R. Matthews, Nucl. Acids Res. 3, 3313-3329 (1976)
77. D. Lohr, J. Corden, K. Tatchell, R.T. Kovacic, K.E. van Holde, Proc.Natn. Acad. Sci. U.S.A. 74, 79-83 (1977)
78. M. Steinmetz, R.E. Streeck, H.G. Zachau (Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht)
79. Y.V. Ilyin, A.J. Varshavsky, V.N. Mickelsaar, G.P. Georgiev, Eur.J. Biochem. 22, 235-245 (1971)
80. A.J. Varshavsky, G.P. Georgiev, Mol. Biol. Rep. 1, 87-92 (1973)
81. E.M. Bradbury, S.E. Danby, P.G. Hartman, P.L. Riches, Eur.J. Biochem. 57, 521-528 (1975)
82. G.E. Chapman, P.G. Hartman, E.M. Bradbury, Eur. J. Biochem. 61, 69-75 (1975)
83. C.B.Anfinsen, P. Cuatrecasas, H. Taniuchi, The Enzyme IV 3rd Ed. 177-204 (Hrsg. P.D. Boyer), Acad.Press New York (1971)
84. D. Lohr, R.T. Kovacic, K.E. van Holde, Biochemistry 16, 463-471 (1977)
85. R.T. Simpson, J.P. Whitlock Jr., Nucl. Acids Res. 3, 117-127 (1976)
86. G. Klobeck, W. Hörz, H.G. Zachau (unveröffentlichte Versuche)
87. H. Weintraub, Proc.Natn. Acad. Sci. U.S.A. 72, 1212-1216 (1975)

88. H. Weintraub, A. Worcel, B. Alberts, Cell 9, 409-417 (1976)
89. A.J. Varshavsky, G.P. Georgiev, Mol. Biol. Rep. 2, 255-262 (1975)
90. J.T. Finch, A. Klug, Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. 73, 1897-1901 (1976)
91. A.E. Dahlberg, C.W. Dingman, A.C. Peacock, J.Mol.Biol. 41, 139-147 (1969)
92. J.P. Whitlock Jr., R.T. Simpson, Nucl. Acids Res. 3, 2255-2266 (1976)
93. W. Pfeiffer, W. Hörz, T. Igo-Kemenes, H.G. Zachau, Nature 258, 450-452 (1975)
94. M. Noll, J.O. Thomas, R.D. Kornberg, Science 187, 1203-1206 (1975)
95. F. Fittler, J. Kruppa, H.G. Zachau, Biochim. Biophys. Acta 277, 513-522 (1972)

7.0 Abkürzungsverzeichnis

A, C, G, T	Desoxyribonukleotide
A ₂₆₀ (230,275)	Extinktion bei 260 (230, 275) nm und 1 cm Schichtdicke
Alu	Restriktionsnuklease aus <i>Arthrobacter luteus</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Bisacrylamid	NN'-Methylenbisacrylamid
Bsu	Restriktionsnuklease aus <i>Bazillus subtilis</i>
Cot	Anfangskonzentration in Mol/l multipliziert mit der Zeit t in Sekunden (Ref.3)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAase I, II	Desoxyribonuklease I (Pankreas), II (Milz, saure)
Eco RI, II	Restriktionsnukleasen aus <i>Escherichia coli</i> mit dem Plasmid RY 13 bzw. R 245
EDTA	Äthylendiamintetraacetat, Na-Salz
HAP	Hydroxyapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Hind II, III	Restriktionsnukleasen aus <i>Haemophilus influenzae</i> Rd
Hpa II	Restriktionsnuklease aus <i>Haemophilus parainfluenzae</i>
min.	Minuten
NP	Nukleotidpaare
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard Natriumcitrat (150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat)
Std.	Stunde(n)
TEMED	NNN'-N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure

tRNA ^{Phe}	Phenylalanin-spezifische Transfer-Ribonukleinsäure
tRNA ^{Ser}	Serin-spezifische Transfer-Ribonukleinsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vol.	Volumen

Lebenslauf

Geboren wurde ich am 22. September 1944 in St. Gallen (Schweiz). Im Anschluß an die Primarschule in Nussbaumen (Thurgau) besuchte ich das Gymnasium in Nuolen (Schwyz) und beendete mit der Maturaprüfung im Juli 1964 das Mittelschulstudium. Nach Ableistung der militärischen Grundausbildung studierte ich vom Wintersemester 1965 bis zum Sommersemester 1967 Germanistik und Philosophie an der Universität Bonn. Im Wintersemester 1967 ging ich nach Innsbruck und begann dort das Studium der Chemie und beendete dieses im September 1974 mit der Doktorandenprüfung. Seit Oktober 1974 arbeite ich unter Anleitung von Prof. Dr. H.G. Zachau und Dr. W. Hörz im Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München an der Doktorarbeit.

